



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA  
ANAERÓBICA ESTRICTA DE LA FLORA INTESTINAL HUMANA PARA ENSAYOS  
*IN-VITRO*”**

Tesis previa a la obtención del título de  
Bioquímico Farmacéutico

**AUTORAS:**

Angélica María López Pesántez  
Janeth Maricela Samaniego Jara

**DIRECTORA:**

Dra. Silvana Patricia Donoso Moscoso.

**ASESORA:**

Dra. Paulina del Rocío Escobar Hinojosa.

**CUENCA-ECUADOR**

**2016**



## RESUMEN

Este trabajo de tesis se realizó con el objetivo de evaluar la viabilidad y caracterizar las bacterias anaerobias estrictas de la flora intestinal humana (*Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*).

Las muestras fueron suministradas por el personal del Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC “*Food, Nutrition and Health*”, quienes se encargaron de los procedimientos de recolección. La cantidad total de muestra provino de 3 individuos que recolectaron la materia fecal en un período de 24 horas durante 3 días consecutivos bajo condiciones estandarizadas y controladas de dieta y recolección según las necesidades investigativas del proyecto.

La caracterización microbiana se realizó por comparación de las poblaciones bacterianas de las muestras fecales de cada individuo mediante cultivo y recuento en medios selectivos; así para *Bacteroides fragilis* en Agar Bacteroides Bilis Esculina, *Clostridium perfringens* en Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina y *Clostridium difficile* en Agar Cicloserina Cefoxitina Fructosa al 7% con sangre de cordero.

Con las muestras fecales se elaboró una suspensión bacteriana a partir de una solución estandarizada de buffer de fosfatos y se conservó en congelación a -80 °C con glicerol al 25% como agente crioprotector. Se evaluó la viabilidad bacteriana a través del tiempo de los tres microorganismos mediante cultivo y recuento en los medios selectivos durante cinco semanas.

De las tres bacterias estudiadas, *Bacteroides fragilis* fue el microorganismo predominante ( $49 \pm 0,8\%$ ), seguido por *Clostridium perfringens* ( $26 \pm 0,8\%$ ) y por último *Clostridium difficile* ( $25 \pm 0,8\%$ ) en las muestras de materia fecal frescas. Los recuentos (UFC/mL) de *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* presentaron diferencia significativa entre los individuos ( $p < 0,001$  y  $p = 0,0001$  respectivamente); mientras que, para los recuentos de *Bacteroides fragilis* no se observó diferencia significativa ( $p = 0,068$ ). En el análisis de la viabilidad de las bacterias se observó que la suspensión bacteriana elaborada y conservada bajo condiciones establecidas mantiene viables a *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* durante las cinco semanas de estudio pero no mantiene viable a *Bacteroides fragilis*.

**Palabras clave:** microbiota intestinal humana, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, viabilidad bacteriana.



## ABSTRACT

This thesis was conducted to assess the feasibility and to characterize the strict anaerobic bacteria of the human intestinal flora (*Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*).

The staff of the Laboratory of Food and Nutrition Project VLIR-IUC “Food, Nutrition and Health”, who were responsible for collection procedures, provided the samples. The total amount of sample came from three individuals who collected the feces over a period of 24 hours for three consecutive days under standardized conditions and controlled diet and collection according to the research needs of the project.

The microbial characterization was performed by comparing bacterial populations of fecal samples from each individual by culturing and counting using selective media. *Bacteroides fragilis* was grown on Bacteroides Bile Agar Esculin, *Clostridium perfringens* was grown on Sulphite Polymyxin Sulfadiazine Agar, and *Clostridium difficile* was grown on Agar Cycloserine Cefoxitin Fructose 7% sheep blood.

The bacterial suspension was elaborated from fecal samples and with a standardized solution for anaerobic phosphate buffer; it was preserved by freezing at - 80 °C with 25% glycerol as cryoprotectant. The bacterial viability was assessed over time by culturing and counting on selective medias for five weeks.

Of the three bacteria studied, *Bacteroides fragilis* was the predominant microorganism ( $49 \pm 0.8\%$ ), followed by *Clostridium perfringens* ( $26 \pm 0.8\%$ ) and *Clostridium difficile* finally ( $25 \pm 0.8\%$ ) for three individuals. Microbial counts of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* present significant difference between individuals ( $p < 0,001$  y  $p = 0.0001$  respectively); while, microbial count of *Bacteroides fragilis* were not significantly different ( $p = 0.068$ ).

The analysis of bacterial viability shows that the bacterial suspension prepared and preserved under conditions established keeps viable to *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* during 5 weeks of study, but this does not maintain viable *Bacteroides fragilis*.

**Keywords:** human intestinal microbiota, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, bacterial viability



## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	7
ÍNDICE DE ANEXOS .....	8
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	9
DEDICATORIA .....	14
AGRADECIMIENTOS .....	15
INTRODUCCIÓN .....	16
CAPÍTULO 1 .....	17
1. MARCO TEÓRICO .....	17
1.1 MATERIA FECAL .....	17
1.2 MICROBIOTA INTESTINAL .....	17
1.2.1 Factores que alteran la microbiota intestinal .....	18
1.2.2 Funciones de la microbiota intestinal .....	18
1.2.3 Composición de la microbiota gastrointestinal .....	20
1.3 BACTERIAS ANAEROBIAS ERICTAS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL .....	22
1.3.1 <i>Bacteroides</i> .....	22
1.3.2 <i>Clostridium</i> .....	24
1.4 IMPORTANCIA DE LOS ENSAYOS IN-VITRO CON MICROBIOTA FECAL .....	27
CAPÍTULO 2 .....	28
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
2.1 METODOLOGÍA DE TRABAJO .....	28
2.1.1. Tipo de estudio .....	28
2.1.2. Descripción de las muestras .....	28
2.1.3. Conservación de las muestras .....	28
2.2. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES .....	28
2.3. TÉCNICAS .....	31
2.3.1. Tratamiento de las muestras .....	31
2.3.2. Pruebas de identificación microbiana .....	34
2.3.3. Fundamento de los medios de cultivo .....	37
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS .....	38
CAPÍTULO 3 .....	39
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

<b>3.1. GENERALIDADES DE LA CARACTERIZACIÓN BACTERIANA .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA FECAL ENTRE INDIVIDUOS .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3 VIABILIDAD MICROBIANA EN LA SUSPENSIÓN BACTERIANA ENTRE SEMANAS.....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>61</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1.</b> Grupo <i>Bacteroides</i> .....	23
<b>Tabla N° 2.</b> Características útiles en la diferenciación de <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium difficile</i> .....	26
<b>Tabla N° 3.</b> Pruebas de identificación para <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium difficile</i> en la suspensión por individuo .....	40
<b>Tabla N° 4.</b> Pruebas de identificación para <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium difficile</i> en la suspensión bacteriana entre semanas .....	42
<b>Tabla N° 5.</b> Resultados del t-test: Recuentos microbianos (UFC/mL) de las suspensiones bacterianas entre semanas.....	48
<b>Tabla N° 6.</b> Precisión intra- e inter-día expresado en porcentaje de coeficiente de variación (%CV). .....	54



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico N° 1.</b> Comparación de las poblaciones microbianas entre individuos.....	45
<b>Gráfico N° 2.</b> Viabilidad de <i>Bacteroides fragilis</i> de la suspensión bacteriana entre semana. ....	49
<b>Gráfico N° 3.</b> Viabilidad de <i>Clostridium perfringens</i> de la suspensión bacteriana entre semana. ....	50
<b>Gráfico N° 4.</b> Viabilidad de <i>Clostridium difficile</i> de la suspensión bacteriana entre semana. ....	51



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo N° 1.</b> Elaboración del buffer de fosfatos.....	61
<b>Anexo N° 2.</b> Medios selectivos de cultivo .....	62
<b>Anexo N° 3.</b> Procesamiento de las muestras de materia fecal.....	68
<b>Anexo N° 4.</b> Técnica de siembra en estría en agar para recuento semicuantitativo de colonias.....	70
<b>Anexo N° 5.</b> Incubación con bolsas para anaerobiosis .....	71
<b>Anexo N° 6.</b> Elaboración de la suspensión bacteriana.....	73
<b>Anexo N° 7.</b> Determinación de la viabilidad bacteriana de la suspensión .....	75
<b>Anexo N° 8.</b> Tinción de Gram .....	77
<b>Anexo N° 9.</b> Prueba de la catalasa .....	79
<b>Anexo N° 10.</b> Prueba de producción de ácido sulfhídrico e indol y motilidad (SIM).....	80
<b>Anexo N° 11.</b> Prueba de fermentación de hidratos de carbono .....	82
<b>Anexo N° 12.</b> Prueba de lecitinasa .....	88
<b>Anexo N° 13.</b> Fluorescencia frente a luz ultravioleta.....	90
<b>Anexo N° 14.</b> Resultados de los recuentos (UFC/mL) en la suspensión bacteriana por individuo.....	91
<b>Anexo N° 15.</b> Resultados de los recuentos (UFC/mL) en la suspensión bacteriana entre semanas .....	92





## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

BBE	Bacteroides Bilis Esculina
c.s.p.	Cantidad suficiente para
CCFA	Agar Fructosa Cicloserina Cefoxitina
CDC	Centro de Control de Enfermedades
CV	Coeficiente de variación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GALT	Tejido Linfoide Asociado al Intestino
Ig A	Inmunoglobulina A
PY	Peptona levadura
rpm	Revoluciones por minuto
SB	Suspensión bacteriana
SIM	Sulfuro, Indol, Movilidad
SPS	Sulfito Polimixina Sulfadiazina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta



Angélica María López Pesántez, autora de la tesis "EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA ANAERÓBICA Estricta DE LA FLORA INTESTINAL HUMANA PARA ENSAYOS IN-VITRO", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 24 de febrero de 2016

Angélica María López Pesántez

C.I: 0105071815



Janeth Maricela Samaniego Jara, autora de la tesis "EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA ANAERÓBICA ESTRICTA DE LA FLORA INTESTINAL HUMANA PARA ENSAYOS IN-VITRO", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 24 de febrero de 2016

---

Janeth Maricela Samaniego Jara

C.I: 0107086159



Universidad de Cuenca  
Cláusula de propiedad intelectual

Angélica María López Pesántez autora de la tesis "EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA ANAERÓBICA ESTRICTA DE LA FLORA INTESTINAL HUMANA PARA ENSAYOS *IN-VITRO*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 24 de febrero de 2016

Angélica María López Pesántez

C.I: 0105071815



Janeth Maricela Samaniego Jara autora de la tesis "EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA ANAERÓBICA ESTRICTA DE LA FLORA INTESTINAL HUMANA PARA ENSAYOS *IN-VITRO*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 24 de febrero de 2016

Janeth Maricela Samaniego Jara

C.I: 0107086159



## DEDICATORIA

*A Dios, por ser mi fuerza interna para seguir adelante y lograr mis metas.*

*A mis abuelitos, Demetrio y Luz; Néstor y Sofía, por todo su amor, comprensión y esperanza que depositaron en mí.*

*A mis padres, Ángel y Margarita, por su esfuerzo y dedicación para darme la mejor educación; por enseñarme que lo más importante en la vida no es lo que logras, sino con quien lo logras, por soñar conmigo los sueños más sorprendentes y creer que los puedo lograr, por guiarme y aconsejarme todos los días de mi vida y por ser la mejor compañía en los momentos de debilidad.*

*A mis hermanos, Edwin, Olger y Jairo por equilibrar mi vida y no dejarme caer en la rutina y por sus ocurrencias que siempre sacan la mejor de mis sonrisas.*

*A mi sobrina, Alis, mi motivo, inspiración y felicidad, por llegar a este mundo en el momento preciso para alegrar todo su alrededor.*

*A mis hermanas no de sangre pero sí de corazón, Graciela, Valeria y Jenny, por su cariño, apoyo y amistad incondicional.*

*A mis amigas, por hacer de la vida universitaria la experiencia más divertida e inolvidable.*

**Janeth Maricela**

*Este trabajo está dedicado a mi familia y seres queridos, quienes con su apoyo, consejos y valores supieron guiarme por el camino correcto.*

*A mis amigas, por acompañarme durante toda mi carrera universitaria; y a mis maestros que contribuyeron con sus conocimientos para la culminación de mi estudio profesional.*

**Angélica María**



## AGRADECIMIENTOS

*Principal agradecimiento para nuestros padres quienes nos han brindado su cariño, confianza y sobre todo su apoyo a lo largo de nuestras vidas.*

*A la Doctora Silvana Donoso, un agradecimiento especial por su apoyo en la dirección de ésta tesis.*

*A la Doctora Paulina Escobar, un especial agradecimiento por la asesoría brindada en éste proyecto.*

*Agradecemos profundamente a la Doctora Johana Ortiz, quien con su conocimiento transmitido hizo posible concluir de manera satisfactoria esta tesis.*

*De igual forma, agradecemos al personal del Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC “Food, Nutrition and Health” de la Universidad de Cuenca, por facilitarnos el uso de sus instalaciones y por su colaboración durante el desarrollo de esta tesis.*

*También agradecemos a nuestros seres queridos quienes de una u otra manera aportaron para la culminación de este trabajo.*

**Angélica María**

**Janeth Maricela**



## INTRODUCCIÓN

El aparato digestivo está constantemente expuesto a una gran cantidad de microorganismos provenientes de los alimentos ingeridos, que colonizan el tracto gastrointestinal y se ubican a lo largo del tubo digestivo. A ésta comunidad de microorganismos se la conoce como flora intestinal o microbiota que incluyen unos 100 billones de bacterias y entre 500 a 1000 especies distintas, siendo la microbiota del colon la predominante en el aparato digestivo y ésta cumple funciones importantes en el metabolismo de sustancias, afectando la disponibilidad de las mismas para ser absorbidas (Guarner Aguilar, 2007).

Para comprender la importancia del efecto de la microbiota con respecto a la absorción de los alimentos se requieren de estudios *in-vivo* e *in-vitro* de la flora intestinal; así como, de procesos de aislamiento, caracterización y estabilización de las bacterias representativas de la microbiota, que se aíslan a partir de materia fecal en medios de cultivo específicos.

El presente trabajo de tesis consistió en la evaluación de la viabilidad de bacterias anaeróbicas estrictas de muestras fecales en una suspensión elaborada a partir de una solución estandarizada. Dicha suspensión se conservó bajo condiciones de almacenamiento establecidas y será utilizada para realizar estudios de absorción intestinal *in-vitro* que son parte de las actividades del Proyecto de investigación VLIR-IUC “*Food, Nutrition and Health*”, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.





## CAPÍTULO 1

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 MATERIA FECAL

La materia fecal, excrementos o heces son el conjunto de restos alimenticios y otras sustancias que no logran atravesar el epitelio intestinal en el transcurso de la absorción, generalmente sólidos o líquidos y que corresponden al producto final en el proceso de digestión. Presenta un pH comprendido entre 6,8 y 7,2. (Segarra, 2006)

La formación de las heces empieza cuando la mayor parte del agua y los electrolitos aún presentes en el quimo (masa pastosa compuesto por alimentos digeridos) son absorbidos en el colon, de forma que las heces excretadas contienen menos de 100 mL de líquido. La mucosa del intestino grueso secreta iones de bicarbonato al mismo tiempo que absorbe un número igual de iones de cloro; el bicarbonato ayuda a neutralizar los productos ácidos que se generan por la acción bacteriana en el colon. (Segarra, 2006)

El peso de las heces varía entre 100 y 200 g/día. La materia fecal contiene agua que representa el 75% del peso total y sólidos en un 25% como celulosa y otras fibras no digeribles, bacterias (cuya composición reflejan la microbiota intestinal), material inorgánico (calcio, fosfatos), grasas, células mucosas descamadas, moco y pequeñas cantidades de enzimas digestivas.

El color café de la materia fecal se debe a la estercobilina y la urobilina que son derivados de la bilirrubina. El olor es generado por los productos de la acción bacteriana sobre ácidos biliares desoxicólico y cólico dando indol, escatol, mercaptanos y sulfuro de hidrógeno; éstos varían de una persona a otra dependiendo de la flora bacteriana y del tipo de alimento que se ingiere. (Segarra, 2006)

#### 1.2 MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota intestinal es el conjunto de gérmenes que conviven con el huésped en estado normal, sin causarle enfermedad. Su composición es característica para la especie humana, tanto en los organismos que la componen como en número y distribución en el tracto intestinal. Está compuesta por gran diversidad de bacterias que cumplen múltiples funciones; tanto su composición como sus funciones están influenciadas por factores externos como el medio ambiente, entre otros. (Mellado, Jos, Moreno, & Camean, 2012) (Gómez & Acero, 2011)



### 1.2.1 Factores que alteran la microbiota intestinal

Las alteraciones cuantitativas y/o cualitativas de la microbiota intestinal pueden afectar la integridad orgánica o funcional de la mucosa intestinal, así como modificar su función inmunomoduladora. El equilibrio presente en la microbiota intestinal es dinámico y sensible a influencias de factores ambientales, anatómicos y funcionales. El balance ecológico del organismo puede alterarse por distintas circunstancias como envejecimiento (produce una disminución natural de los probióticos del organismo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*), dieta, fármacos (antibióticos y hormonas), factores medioambientales, condiciones de estrés, disminución de las defensas, etc. (Sáez, 2008) (Thompson, Maldonado, & Gill, 2004)

### 1.2.2 Funciones de la microbiota intestinal

Las funciones de la microbiota intestinal se pueden dividir en tres grandes grupos: metabólicas o nutritivas, protectoras e inmunológicas.

- **Funciones metabólicas o nutritivas**

La función metabólica principal de la microbiota intestinal es la fermentación de los sustratos de la dieta no digeribles como la fibra vegetal (oligo y polisacáridos) y del moco producido por el epitelio intestinal (glicanos endógenos: mucinas, glicoesfingolípidos, etc.), con ello se recupera energía metabólica en forma de nutrientes asimilables. (Guarner Aguilar, 2007) (Guarner & Malagelada, 2003)

La fermentación de hidratos de carbono no digeribles por el individuo tiene lugar fundamentalmente en el ciego y constituye una fuente de energía importante para la proliferación bacteriana; además, se produce ácidos grasos de cadena corta, principalmente ácido butírico, propiónico y acético, que constituyen entre el 83 y 95% del total. (Gómez & Acero, 2011) (Sanz, Collado, Haros, & Dalmau, 2004) (Devaraj, Hemarajata, & Versalovic, 2013)

Los ácidos grasos de cadena corta generados desempeñan importantes funciones a nivel local (intestinal) y sistémico. Actualmente, se considera que éstos pueden contribuir a la función barrera o protectora del epitelio intestinal; modificar el metabolismo del nitrógeno; mejorar la absorción de minerales y modificar el metabolismo de los ácidos biliares y los lípidos. (Guarner Aguilar, 2007) (Devaraj, Hemarajata, & Versalovic, 2013)



La diversidad de genes en la comunidad microbiana que colonizan la luz del colon, codifican un gran número y variedad de proteínas y enzimas distintas de los recursos propios del individuo, que intervienen en actividades metabólicas que se desarrollan continuamente en el intestino; es decir, se trata de recursos bioquímicos que no están presentes en el genoma humano y por tanto, sus funciones no se producirían en ausencia de vida bacteriana en el colon. (Guarner Aguilar, 2007)

Entre las funciones metabólicas también se incluyen la producción de vitaminas (K, B<sub>12</sub>, biotina, ácido fólico y pantoténico) que se absorbe en el ciego y colon derecho, y favorecen la recuperación y absorción de iones como calcio, hierro y magnesio. (Noriega, 2011)

La síntesis de vitaminas se ha atribuido a diversos grupos de la flora intestinal (*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Fusobacterium*), y también a bacterias lácticas utilizadas en fermentaciones alimentarias (*Propionibacterium* y *Lactobacillus*). (Sanz, Collado, Haros, & Dalmau, 2004)

- **Funciones protectoras**

La flora residente en el tubo digestivo representa una barrera formidable para el establecimiento de poblaciones patógenas en el huésped, éste fenómeno es conocido como “efecto barrera” o “interferencia bacteriana”, que es consecuencia del hecho de que ocupa los nichos ecológicos accesibles y administra, consume y agota todos los recursos. (Guarner & Malagelada, 2003)

Las bacterias comensales también inhiben el crecimiento de sus competidores mediante la producción de sustancias antimicrobianas llamadas bacteriocinas, que son péptidos conocidos como “autobióticos” y que se expresan de forma específica para cada especie, conjuntamente incluye la generación de productos metabólicos y otras condiciones inhibitorias como disminución del pH y depleción de los nutrientes requeridos para la multiplicación de los patógenos. Por ejemplo, se ha observado que *Bacteroides thetaiotaomicron* consume fucosa producida por el epitelio intestinal pero, además, puede controlar la expresión de genes en las células del epitelio y regular la producción de fucosa. Con ello se evita la sobreproducción de este recurso, que podría ser utilizado por otras bacterias patógenas o al menos por oportunistas. (Guarner & Malagelada, 2003)

Existe una barrera física por medio de una capa de moco epitelial, la cual está constituida por glicoproteínas mucinosas que contribuyen a la formación de una película gelatinosa sobre la superficie epitelial de su microbiota, impidiendo el ataque y la



penetración de patógenos entero-invasivos a las células intestinales. (Guarner Aguilar, 2007)

Además, la microbiota ejerce una influencia muy importante en el desarrollo y maduración del sistema inmune asociado al tubo digestivo. Los mamíferos criados en condiciones experimentales de asepsia total y que, por tanto, no adquieren su flora natural, no se desarrollan normalmente. Hay importantes diferencias fisiológicas y hasta anatómicas en su tubo digestivo. Tienen una deficiencia de inmunoglobulinas tanto en la luz intestinal como en sangre periférica. Estos animales son muy susceptibles al contagio e infección por mínima exposición a cualquier agente infeccioso. (Thompson, Maldonado, & Gill, 2004)

- **Funciones inmunológicas**

La comunidad bacteriana nativa gastrointestinal estimula la función inmune tanto a nivel local como sistémico. Las interacciones entre la mucosa, la microbiota gastrointestinal y el tejido linfoide asociado con el intestino (GALT) son fundamentales para la defensa del huésped contra la invasión patógena. (Guarner Aguilar, 2007) (Gómez & Acero, 2011)

Las bacterias comensales influyen en el desarrollo de los componentes humorales del sistema inmune de la mucosa (Ig A) y también modulan la producción de las citoquinas por parte de las células T y T-helper (Th) tipo 1 y tipo 2, influenciando las funciones de las células dendríticas, de linfocitos B y de las células epiteliales. En personas sanas las bacterias comensales inducen cierto grado de tolerancia inmunológica, en contraste con la reacción inflamatoria agresiva que se produce frente a patógenos ajenos a la flora normal. La habilidad del intestino para diferenciar la flora normal de microorganismos patógenos involucra procesos de vigilancia y reconocimiento inmunológico. (Guarner Aguilar, 2007) (Gómez & Acero, 2011)

### **1.2.3 Composición de la microbiota gastrointestinal**

A nivel del tubo digestivo la colonización de la flora comensal es diferente. La prevalencia de las bacterias en las distintas partes del tracto gastrointestinal depende del pH, el peristaltismo, las propiedades de adhesión bacteriana, la secreción de mucina que contiene inmunoglobulinas (Ig A), la disponibilidad de nutrientes, la dieta, el antagonismo bacteriano, entre otras. (Gómez & Acero, 2011) (Ingraham & Ingraham , 1998)



- **Microbiota del estómago**

La mayoría de las bacterias del estómago no sobreviven por el pH bajo del medio, alrededor de pH 2. Las concentraciones bacterianas detectadas son inferiores a  $10^3$  UFC/mL. (Gómez & Acero, 2011) (Torres, 2015)

La densidad de bacterias es relativamente baja y se compone de gérmenes de la flora orofaríngea que han sido deglutidos, como *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolítico, *Lactobacillus* sp., cocos anaerobios, *Cándida* sp. y otros gérmenes capaces de resistir el medio ácido. (Gómez & Acero, 2011) (Thompson, Maldonado, & Gill, 2004)

- **Microbiota del intestino delgado**

El intestino delgado comprende el duodeno, yeyuno e íleon. La velocidad del contenido intraluminal del intestino delgado disminuye en la medida que se avanza desde el duodeno hasta el íleon. Los microorganismos aislados provienen de zonas proximales del tracto gastrointestinal mediante la comida ingerida y descienden por el intestino unidos al quimo. (Gómez & Acero, 2011) (Thompson, Maldonado, & Gill, 2004)

Los dos tercios superiores del intestino, el duodeno y yeyuno, tienen una baja concentración de microorganismo, entre  $10^3$  y  $10^5$  bacterias/mL, siendo especies de Gram positivos como *Lactobacillus* y *Streptococcus* los que predominan, mientras que en zonas más distales los anaerobios son los predominantes (*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*). La microbiota del íleon se asemeja en su gran mayoría a la del colon, debido al paso de microorganismos del ciego a través de la válvula ileocecal causando un aumento de  $10^7$  a  $10^8$  UFC /mL. Además, en ésta zona terminal del intestino delgado ocurre una disminución en la velocidad del tránsito intestinal y de la acidez, lo cual hace de la microbiota ileal un ecosistema más diverso que el del resto de las porciones del intestino delgado. (Gómez & Acero, 2011) (Thompson, Maldonado, & Gill, 2004) (Torres, 2015)

- **Microbiota del intestino grueso**

El intestino grueso desde el ciego hasta el recto contiene más de 500 géneros de bacterias, con una concentración de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  UFC /mL. La microbiota del colon está compuesta en especial por anaerobios en un 99,9%. (Gómez & Acero, 2011)

Las bacterias representan aproximadamente el 40% del peso en seco de la materia fecal. El aumento del contenido bacteriano probablemente se explica por:

- Disminución del peristaltismo



- Aumento del pH, cercano al fisiológico
- Disminución del contenido de agua

Pasando la válvula ileocecal los gérmenes de la flora alcanzan concentraciones de  $10^7$  a  $10^9$  bacterias/mL. Corresponden en su mayoría a microorganismos de los géneros *Bacteroides* y *Fusobacterium* entre los bacilos Gram negativos y especies de *Peptostreptococcus*, *Sarcina* y *Veillonella*. (Gómez & Acero, 2011) (Torres, 2015) (Thompson, Maldonado, & Gill, 2004) (Torres, 2015)

Los bacilos Gram positivos están representados por especies de *Bifidobacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Clostridium*. Entre los anaerobios facultativos predominan las enterobacterias, siendo *Escherichia coli* la más numerosa, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. (Thompson, Maldonado, & Gill, 2004) (Torres, 2015)

Dentro de especies de cocos Gram positivos pueden hallarse especies de *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. (Thompson, Maldonado, & Gill, 2004) (Torres, 2015)

### 1.3 BACTERIAS ANAEROBIAS ESTRUCTAS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Las bacterias anaerobias estrictas son aquellas que sólo crecen en ausencia de oxígeno, que es letal para ellas. Dentro de la microbiota intestinal humana, el género *Bacteroides* es uno de los más abundantes. También son dominantes otros microorganismos Gram positivos no esporulados pertenecientes a los géneros *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Veillonella*. Los bacilos Gram positivos esporulados están representados esencialmente por *Clostridium*. (Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2008)

#### 1.3.1 *Bacteroides*

*Bacteroides* es uno de los más importantes géneros de bacterias anaerobias Gram negativas que forman parte de la microbiota intestinal. Pertenecen a la familia *Bacteroidaceae*.

*Bacteroides spp.* tiene gran importancia en salud pública por estar involucrado en procesos infecciosos y resistencia a antimicrobianos. El problema para los humanos ocurre cuando *Bacteroides* escapa del tracto intestinal y coloniza otros órganos; el 80% de las infecciones anaerobias es causado por *Bacteroides*, las infecciones pueden

ocurrir en cualquier parte del cuerpo y están comúnmente asociadas con formación de abscesos. (Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2008)

*Bacteroides* es un componente necesario de la microbiota intestinal por los siguientes beneficios:

- Es importante en la biotransformación del ácido biliar.
- Utiliza el suministro de alimentos que es necesario para patógenos verdaderos como *Salmonella*.
- Su metabolismo anaerobio provee una gran cantidad de energía, suministro necesario para otras enterobacterias.
- Fermenta carbohidratos. (Price & Frey, 2003)

Taxonómicamente, el género *Bacteroides* puede ser dividido en especies que son resistentes a la bilis y otras que son sensibles a la bilis (tabla N° 1). Muchos anaerobios que fueron previamente clasificados como *Bacteroides spp.* bilis-sensible han sido reclasificados dentro del género *Porphyromonas* y *Provetella*. (Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2008) (Rodríguez, Gamboa, Rodríguez, & Vargas, 2006)

**Tabla N° 1.** Grupo *Bacteroides*

Especies bilis resistentes		Especies bilis-sensibles
Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	Otras especies de <i>Bacteroides</i>	
<i>Bacteroides caccae</i> <i>Bacteroides distasonis</i> <i>Bacteroides eggerthii</i> <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides merda</i> <i>Bacteroides ovatus</i> <i>Bacteroides stercoris</i> <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Bacteroides uniformis</i> <i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Bacteroides coagulans</i> <i>Bacteroides putredenis</i> (algunas cepas son bilis-sensible) <i>Bacteroides pyogenes</i> <i>Bacteroides splanchnicus</i> <i>Bacteroides tectus</i>	<i>Bacteroides capillosus</i> (algunas cepas son bilis-resistentes) <i>Bacteroides forsythus</i> (recientemente reclasificado como <i>Tannerella forsythensis</i> ) <i>Bacteroides ureolyticus</i>

Fuente: (Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2008)

En la actualidad, todos aquellos anaerobios estrictos, Gram negativos, sacarolíticos, resistentes a la bilis, con porcentajes de guanina y citosina entre el 40% y el 48%, entre otras características, se incluyen dentro del denominado “grupo *Bacteroides fragilis*”,





que comprende las 10 especies mencionadas en la tabla N° 1. (Rodríguez, Gamboa, Rodríguez, & Vargas, 2006)

*Bacteroides uniformis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus* y *Bacteroides thetaiotaomicron* son las especies más frecuentes del grupo *Bacteroides fragilis* encontradas en heces normales no diarreicas. (Rodríguez, Gamboa, Rodríguez, & Vargas, 2006)

- **Grupo *Bacteroides fragilis***

**Morfología:** Los microorganismos del grupo *Bacteroides fragilis* son bacterias Gram negativas, cocobacilares o bacilos rectos, anaerobios estrictos, no móviles, con extremos redondeados de 0,5-0,8 µm x 1,5-9 µm de diámetro. Presentan vacuolas grandes que pueden aparentar esporas; sin embargo, la especie no forma esporas y usualmente tiene una cápsula grande de polisacáridos. (Koneman & Allen, 2008)

**Cultivo:** *Bacteroides fragilis* crece fácilmente en agar sangre. Una característica clave de las especies del grupo *Bacteroides fragilis* es que hidrolizan la esculina y su crecimiento mejora con bilis. (Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2008) (Koneman & Allen, 2008)

Los miembros del grupo *Bacteroides fragilis* en Agar *Bacteroides* Bilis Esculina (BBE) producen colonias, convexas, oscuras (grises o negras) y mayores a 1 mm de diámetro. El viraje del medio de ámbar a oscuro se da como resultado de la hidrólisis de la esculina que genera compuestos que acidifican el agar. (Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2008)

**Identificación:** *Bacteroides fragilis* se identifica mediante características específicas que se indican en la tabla N° 2.

### 1.3.2 *Clostridium*

*Clostridium* es un género de bacterias que pueden ser anaerobias estrictas o anaerobias moderadas. Son bacilos Gram positivos, formadores de esporas, pleomórficos, relativamente grandes y de gran motilidad. Pertenecen a la familia *Clostridiaceae*. (Sanz, Collado, Haros, & Dalmau, 2004)

*Clostridium* junto con *Bacteroides* y bacterias lácticas de la microbiota intestinal contribuyen a la hidrólisis de proteínas derivadas de la dieta y a la mejoría de su biodisponibilidad a través de la generación de aminoácidos. Pueden estar implicadas en el aporte de aminoácidos al huésped, derivados de su actividad biosintética, como lisina, treonina, arginina, ácido glutámico y cisteína (Sanz, Collado, Haros, & Dalmau, 2004).





- ***Clostridium perfringens***

**Morfología:** *Clostridium perfringens* es un bacilo Gram positivo bastante grueso y corto con apariencia a ladrillo, de 0,6 a 2,4 µm de ancho y de 1,3 a 1,9 µm de largo, presentándose solos o en parejas, completamente inmóvil, anaerobio estricto, no crece en atmósfera mayor al 5% de oxígeno. Presenta esporas ovales que son grandes, centrales o subterminales. Presenta una cápsula formada de polisacáridos que varían según la cepa. (Koneman & Allen, 2008) (Prats, 2006)

*Clostridium perfringens* puede formar cinco tipos de toxinas: A, B, C, D, y E. La toxina A es la causante de la mayoría de las enfermedades que afectan al hombre, la toxina C causa la mayor parte de las patologías animales, pero también está asociada con la enterocolitis necrotizante en el humano. (Silva , García , Desongles , & Ponce , 2006)

**Cultivo:** para la recuperación de *Clostridium perfringens* a partir de muestras clínicas se puede utilizar agar sangre para anaerobios, agar Brucella, etc. Basados en la capacidad reductora de los clostridios, se puede emplear el medio selectivo Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) que contiene un amplio espectro de nutrientes. El sulfito es reducido por la mayoría de los clostridios a sulfuro, que reacciona con el citrato de hierro y causa que las colonias se tornen de color negro a temperaturas óptimas de crecimiento de 43°C a 47°C, máximo 50°C. (Koneman & Allen, 2008)

**Identificación:** *Clostridium perfringens* se identifica mediante la prueba de lecitinasa y otras pruebas especificadas en la tabla N° 2.

- ***Clostridium difficile***

**Morfología:** *Clostridium difficile* es un bacilo Gram positivo relativamente largo, formador de esporas ovales generalmente subterminales, capsulado, anaerobio estricto, móvil, catalasa negativo o positivo débil. (Bouza , Peláez , & Catalán , 2001)

Es parte de la microbiota intestinal en individuos sanos y pacientes hospitalizados. Es la causa más importante de Colitis Pseudomembranosa, una infección del colon, con frecuencia secundaria a la erradicación de la microbiota saprofita por el uso extenso de antibióticos. Produce dos toxinas, una enterotoxina (toxina A) que es la responsable de la quimiotaxis y una citotoxina (toxina B) que induce la despolimerización de la actina con pérdida del citoesqueleto celular. (Kelly & LaMont, 2008)

**Cultivo:** Su aislamiento, a partir de heces, se realiza en un medio selectivo de Cicloserina Cefoxitina Fructosa (CCFA). El medio es inoculado con la muestra fecal y

se incubaba a 37°C durante 48 a 72 horas en atmósfera anaerobia, ya que un período de incubación de 24 horas no es suficiente para su óptima recuperación.

El crecimiento de *Clostridium difficile* es muy característico por la morfología de la colonia, olor a estiércol de caballo, y propiedades fluorescentes (las colonias presentan a la luz ultravioleta una fluorescencia verde). (Bouza , Peláez , & Catalán , 2001)

**Identificación:** *Clostridium difficile* se identifica mediante características específicas que se indican en la tabla N° 2.

**Tabla N° 2.** Características útiles en la diferenciación de *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*

Prueba	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium difficile</i>
Motilidad	-	-	+
Indol	-	-	...
Catalasa	+	-/d	-/d
Producción de ácido sulfhídrico	...	+	...
Producción de lecitinasa	...	+	...
Fluorescencia en CCFA	...	...	Verde
Producción de ácido a partir de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arabinosa</li> <li>• Celobiosa</li> <li>• Glucosa</li> <li>• Melecitosa</li> <li>• Ramnosa</li> <li>• Ribosa</li> <li>• Salicina</li> <li>• Sacarosa</li> <li>• Trehalosa</li> <li>• Xilano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-</li> <li>-/d</li> <li>+</li> <li>-</li> <li>-</li> <li>-</li> <li>-</li> <li>+</li> <li>-</li> <li>-</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> <li>...</li> </ul>
+ Reacción positiva para el 90% o más de las cepas (incluye reacción fuerte o débil). - Menos del 10% de cepas negativas. ... Prueba no aplicada. d Reacción débil.			

Fuente: (Koneman & Allen, 2008)



#### 1.4 IMPORTANCIA DE LOS ENSAYOS *IN-VITRO* CON MICROBIOTA FECAL

La composición de la microbiota normal juega un papel importante en la salud del huésped, ya que está involucrada en la nutrición, patogénesis e inmunología del mismo. (Kim, Nam, & Cerniglia, 2011)

En los últimos años, se ha llevado a cabo numerosos estudios *in-vitro* acerca de la microbiota intestinal humana dirigidos desde varios campos; por ejemplo, en el área clínica se resalta la influencia de la microbiota intestinal normal en la salud del huésped, en las funciones metabólicas como la recuperación de energía a partir de sustratos no digeribles de la dieta, en la capacidad para reducir infecciones intestinales y en el efecto positivo en la prevención y/o mejora de los síntomas de algunas patologías, como intolerancias alimentarias, diarreas, estreñimiento, enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer o alergias, entre otras. (Álvarez, 2013) (Fernández, 2014)

Con respecto al área alimenticia existe una creciente evidencia que demuestra que el valor nutricional de los alimentos está influenciado, en parte, por la estructura y el funcionamiento de la comunidad microbiana intestinal del huésped, y que la comida, a su vez, da forma a la microbiota y a su vasta colección de genes microbianos. Por lo tanto, para definir el valor nutricional de los alimentos y de un mejor estado de nutrición, se necesita saber más acerca de nuestras diferencias microbianas y sus orígenes, poniendo en consideración cómo nuestro estilo de vida influye en el conjunto de las comunidades microbianas intestinales. (Kau, Ahrn, Griffin, Goodman, & Gordon, 2011)

Hoy en día, el conocimiento sobre la función de la microbiota intestinal no está esclarecido en su totalidad, pues sólo el conocer la composición de la comunidad microbiana no es suficiente para comprender el papel fundamental de la microbiota en el huésped, por lo que hace falta estudios por metagenómica, es decir, la secuenciación del ADN total de la comunidad microbiana sin necesidad de aislar y cultivar esas especies. (Lozupone, Stombaugh, Gordon, Jansson, & Knight, 2012)



## CAPÍTULO 2

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 METODOLOGÍA DE TRABAJO

##### 2.1.1. Tipo de estudio

Se trata de un estudio analítico, de corte transversal, con un componente cuasi-experimental.

##### 2.1.2. Descripción de las muestras

Las muestras de materia fecal fueron suministradas por el personal del Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC “*Food, Nutrition and Health*”, quienes se encargaron de los procedimientos de recolección según las necesidades investigativas del proyecto.

La cantidad total de muestra provino de tres individuos que recolectaron la materia fecal en un período de 24 horas durante tres días consecutivos (asignados como D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>) bajo condiciones estandarizadas y controladas de dieta y recolección.

Durante los tres días de recolección se receptó una muestra por individuo a la 7h30 y se procesó a las 8h00.

##### 2.1.3. Conservación de las muestras

Las muestras se conservaron en un frasco plástico cubiertas con glicerol y dentro de un cooler a una temperatura de 2-6 °C hasta su procesamiento

#### 2.2. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

Los equipos, reactivos y materiales empleados para el procesamiento de las muestras se detallan a continuación:

##### EQUIPOS

- Autoclave TUTTNAUER, 2340 MK
- Estufa bacteriológica MEMMERT, 100-800
- Hornilla eléctrica PROCTOR SILEX, EM-2
- Plancha agitadora VELP SCIENTIFICA, E008



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Agitador horizontal VWE, E003
- Refrigeradora INDURAMA, RI-425
- Freezer a -80°C MYBIO DAIREI, E014
- Destilador de agua FANEM, 724
- Microscopio binocular OLYMPUS, CX31RBSFA
- Cabina de bioseguridad tipo II LABCONO, DO55730
- Balanza analítica BOECO, BBL31
- Centrifuga refrigerada HETTICH, Mikro 220 R
- Balanza digital OHAUS, Scout Pro
- Potenciómetro METTLER TOLEDO, Seven easy
- Cabina extractora de vapores y gases NOVATECH CE, 180-A
- Baño ultrasónico BRANSON, 3510R-DTH
- Generador de Nitrógeno DOMNICK HUNTER, E13
- Vórtex VELP SCIENTIFICA, F202A0173

## REACTIVOS

- Set de reactivos para tinción de Gram PROMECLIN®
- Peróxido de hidrógeno 3% PARACELSO®
- Solución salina al 0,9% estéril
- Etanol 70%
- Etanol 95%
- Agua destilada
- Glicerol PANREAC®
- Fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ) SIGMA®
- Fosfato monopotásico ( $KH_2PO_4$ ) SIGMA®
- Fosfato disódico ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ) SIGMA®
- Tioglicolato de sodio SIGMA®
- Agar Bacteroides Bilis Esculina HIMEDIA®
- Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) MERCK®
- Agar Cicloserina Cefoxitina Fructosa al 7% con sangre de cordero (CCFA) BD
- Agar SIM SCHARLAU®
- Reactivo de Kovacs
- Aceite de inmersión PROMECLIN®
- Bolsas de anaerobiosis OXOID®
- Peptona de carne MERCK®



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Extracto de levadura MERCK®
- Azul de bromotimol SIGMA ®
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) SIGMA ®
- Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) SIGMA ®
- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) SIGMA ®
- Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) SIGMA ®
- Vitamina K (fitomenadiona) SIGMA ®
- Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) SIGMA ®
- Ribosa SIGMA ®
- Trehalosa SIGMA ®
- Glucosa SIGMA ®
- Maltosa SIGMA ®
- Sacarosa SIGMA ®
- Tripticasa soya SIGMA ®
- Agar-agar SIGMA ®
- Huevo criollos de gallina del día
- Sangre humana con EDTA
- Sangre de cordero con EDTA
- Ácido clorhídrico 1N ( $\text{HCl}$ ) SIGMA ®

## MATERIALES

- Algodón
- Gasa
- Papel toalla
- Papel de empaque
- Plástico de cocina
- Cinta testigo
- Lámpara de alcohol
- Frasco plástico 4 L
- Frascos para muestra de orina
- Papel aluminio
- Cooler
- Geles refrigerantes
- Balde plástico 8 L
- Espátula



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Jabón de amonio cuaternario GERMIDAL (Life)
- Gradilla de 10 tubos
- Capuchones metálicos de aluminio de 20 mm de diámetro con orificio central
- Tubos falcon 25 - 50 mL HEATHROW
- Cajas monopetri descartables 94 x 16 mL
- Asa bacteriológica punta recta
- Asa bacteriológica punta redonda calibrada 0,01 mL HIMEDIA
- Pera de succión
- Pipetas serológicas 1, 2 ,5 y 10 mL
- Jarra Gaspak
- Vasos de precipitación 100, 250 y 600 mL
- Varillas de vidrio
- Tubos tapa rosca 15 x 90 mm
- Tubos de ensayo 12 x 75 mL
- Probetas 10, 100, 250 y 500 mL
- Balón de aforo 100 y 250 mL
- Embudo caña corta
- Frasco de vidrio de 750 mL
- Erlenmeyer 100, 250, 500 y 1000 mL
- Frascos de vidrio con tapón de caucho de 120 mL de capacidad
- Placas portaobjetos 25,4 x 76,2 mm
- Laminillas cubreobjetos 22 x 22 mm

### 2.3. TÉCNICAS

#### 2.3.1. Tratamiento de las muestras

- **Criterios generales**
  - a) Una vez recibidas las muestra de los tres individuos (que se denominaron como  $V_1$ ,  $V_2$  y  $V_3$ ) en el Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC “*Food, Nutrition and Health*” de la Universidad de Cuenca, se desinfectó la parte externa de los recipientes con una gasa y alcohol al 70%.
  - b) Se elaboró el buffer de fosfatos (Anexo N° 1).
  - c) Se elaboraron los medios de cultivo selectivos para los microorganismos seleccionados para el estudio. *Bacteroides fragilis*, agar BBE; *Clostridium perfringens*, agar SPS y *Clostridium difficile*, agar CCFA con 7% de sangre de



cordero (Anexo N° 2). La elección de estos microorganismos se basó en dos criterios; primero, la mayor prevalencia de los mismos en la microbiota fecal y segundo, la mayor facilidad de cultivo *in-vitro*.

- **Tratamiento de las muestras por individuo**

Este procedimiento se efectuó con el objetivo de obtener datos por individuo para la caracterización microbiana y la suspensión bacteriana elaborada se desechó luego de la inoculación en los medios de cultivo selectivos siguiendo procedimientos de descontaminación y desinfección estandarizados.

- a) Se realizó una suspensión de cada muestra individual con el buffer de fosfatos (0,5 g de muestra con 12,5 mL de buffer) se homogeneizó y centrifugó. El sobrenadante obtenido fue la suspensión bacteriana que se cultivó por triplicado en los medios selectivos (Anexo N° 3) aplicando la técnica de siembra en estría para recuento semicuantitativo (Anexo N° 4).
- b) Una vez inoculadas todas las muestras en los medios de cultivo se procedió a incubar en ambiente anaerobio (Anexo N° 5). *Bacteroides fragilis* y *Clostridium difficile* a 37 °C y *Clostridium perfringens* a 46 °C por 48 horas.

- **Tratamiento de la mezcla de las muestras fecales**

Se mezcló la materia fecal de los tres individuos formando una sola muestra y se fraccionó en porciones de 20 g para elaborar la suspensión bacteriana mediante la adición de 500 mL de buffer de fosfatos a cada fracción, se homogenizó y se distribuyó en tubos falcon de 50 mL de capacidad y se centrifugó (Anexo N° 6). El sobrenadante obtenido se cultivó e incubó como lo indicado para las muestras individuales.

Las suspensiones bacterianas elaboradas en éste apartado (denominadas como SB<sub>1</sub>, SB<sub>2</sub> y SB<sub>3</sub> correspondientes a los días D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>) se conservaron bajo condiciones estandarizadas de almacenamiento y se evaluó la viabilidad bacteriana de los tres microorganismos en estudio a través del tiempo.





- **Conservación de las suspensiones bacterianas**

Las suspensiones bacterianas obtenidas mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior se conservaron distribuidas en tubos falcon debidamente etiquetados (código de la muestra, fecha, número de tubo) en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  con glicerol al 25% como agente crioprotector para la determinación de la viabilidad bacteriana a través del tiempo y para su posterior uso en los proyectos de investigación del laboratorio.

- **Viabilidad bacteriana**

- a) Las suspensiones bacterianas  $\text{SB}_1$ ,  $\text{SB}_2$  y  $\text{SB}_3$  conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se sometieron a descongelación, pasando las muestras primero a refrigeración por 12 horas y posteriormente a temperatura ambiente por 4 horas.
- b) Las suspensiones bacterianas completamente descongeladas se homogeneizaron y se cultivaron por triplicado en los medios selectivos. El cultivo se realizó cada siete días durante cinco semanas, mismas que se asignaron como semana 0 =  $T_0$ , semana 1 =  $T_1$ , semana 2 =  $T_2$ , semana 3 =  $T_3$  y semana 4 =  $T_4$  (Anexo N° 7). Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la tinción de Gram, pruebas bioquímicas y recuentos microbianos.

- **Pruebas de identificación de las bacterias**

Transcurrido el tiempo de incubación de los cultivos tanto de la suspensión bacteriana por individuo como de la suspensión de la mezcla de materia fecal se realizó la tinción de Gram (Anexo N° 8) de 3 colonias diferentes del mismo cultivo para comparar la compatibilidad morfológica con el microorganismo esperado; se procedió con pruebas confirmatorias para cada uno de los microorganismos aislados y se ejecutó el recuento de las colonias en forma manual para determinar las UFC /mL (Anexo N° 4).

Pruebas confirmatorias:

- Prueba de catalasa (Anexo N° 9)
- Prueba de producción de ácido sulfhídrico e indol y motilidad (Anexo N° 10).



- Prueba de fermentación de hidratos de carbono (*Bacteroides fragilis*) (Anexo N° 11).
- Prueba de lecitinasa (*Clostridium perfringens*) (Anexo N° 12).
- Fluorescencia frente a luz ultravioleta (*Clostridium difficile*) (Anexo N° 13).

Conforme lo indicado en los apartados anteriores se procedió durante los tres días de la semana de recolección de muestras (asignada como T<sub>0</sub>).

### 2.3.2. Pruebas de identificación microbiana

- **Fundamento de la tinción de Gram**

La tinción de Gram es la técnica principal utilizada para el examen microscópico de las bacterias y permite diferenciar bacterias Gram positivas de Gram negativa. Se basa en la utilización de cuatro reactivos:

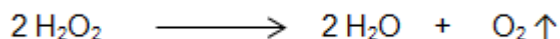
1. Violeta de genciana: violeta de genciana, alcohol etílico al 95%, oxalato de amonio y agua destilada.
2. Yoduro de Gram: yoduro de potasio, cristales de yodo y agua destilada.
3. Decolorante: acetona y alcohol etílico al 95%.
4. Contra-coloración: safranina O y alcohol al 95%.

El colorante violeta de genciana o violeta cristal se une a la pared bacteriana luego del tratamiento con una solución de yoduro, que actúa como mordiente para fijar el colorante. Algunas especies de bacterias, tienen la capacidad de retener el violeta de genciana aún luego del tratamiento con un decolorante orgánico, como la mezcla en partes iguales de acetona y alcohol al 95%. Las bacterias que retienen el colorante aparecen de color azul-negro cuando se observan al microscopio y se denominan Gram positivas. Ciertas bacterias pierden el colorante principal violeta de genciana cuando se las trata con el decolorante orgánico, estas bacterias cambian de color, toman la contracoloración de safranina y aparecen de color rojo vistas al microscopio; son las Gram negativas. (Koneman & Allen, 2008)

Las diferencias en la composición de las paredes de las células Gram positivas, que contienen una capa gruesa de peptidoglicano con numerosos enlaces cruzados de ácido teicoico, y las paredes de las células Gram negativas, en las que la capa de peptidoglicano es más delgada, explican las diferencias de la tinción de Gram entre estos dos grupos principales de bacterias. ( Tortora, Funke, & Case, 2007)

- **Fundamento de la prueba de la catalasa**

La catalasa es un enzima, oxidoreductasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y oxígeno ( $\text{O}_2$ ). El desprendimiento de oxígeno origina burbujeo. (MacFaddin, 2003)



- **Fundamento de la prueba de motilidad**

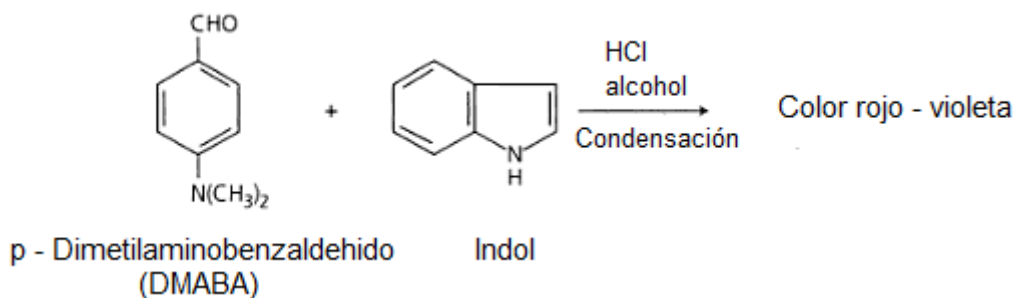
Esta prueba permite determinar si un microorganismo presenta motilidad o no. Las bacterias con motilidad pueden tener flagelos que serán únicos o múltiples y su ubicación varía según las especies bacterianas y las condiciones de cultivo. Los microorganismos inmóviles carecen de flagelos.

Los medios para analizar motilidad tienen concentraciones de agar de 0,4% o menores que permitan el desplazamiento del microorganismo a través del agar. Con concentraciones mayores, el gel es demasiado firme como para permitir que los microorganismos se dispersen con libertad. (MacFaddin, 2003)

- **Fundamento de la prueba de producción de indol**

Esta prueba permite determinar la capacidad de un microorganismo para separar indol a partir de triptófano. El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias por acción de enzimas intracelulares denominadas “triptofanasas” para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol y ácido indolacético. (MacFaddin, 2003)

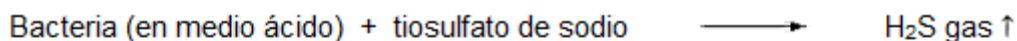
El indol en solución de ácido clorhídrico reacciona con aldehídos (reactivo de Kovacs) dando como resultado una quinona, que es un compuesto importante productor de color rojo-violeta. La capa alcohólica extrae y concentra el complejo de color. Éste complejo es soluble en éter etílico, alcohol etílico, alcohol isoamílico, alcohol amílico o alcohol butírico. (MacFaddin, 2003)





- **Fundamento de la prueba de producción de ácido sulfhídrico**

Esta prueba permite determinar si se ha liberado enzimáticamente ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) gaseoso de los aminoácidos azufrados (metionina, cistina y cisteína), por acción de las enzimas cisteína desulfhidrasa y la tiosulfato reductasa sobre las proteínas, para producir una reacción coloreada visible negra, en presencia de un sistema indicador de  $H_2S$ , como el tiosulfato e iones metálicos. Las bacterias reductoras de sulfato en medio ácido reaccionan con el tiosulfato de sodio para producir un sulfito y sulfato. El tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) reemplaza al sulfato como aceptor de electrones y es la fuente de azufre del microorganismo. El  $H_2S$  liberado es un gas incoloro que se pone de manifiesto al reaccionar con una sal fuerte de hierro, generando un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso metálico. (MacFaddin, 2003)



- **Fundamento de la prueba de fermentación de hidratos de carbono**

Esta prueba permite determinar la capacidad de un microorganismo para fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal y producir ácido o ácido y gas visible. Los hidratos de carbono y alcoholes, en conjunto denominados “azúcares”, rinden pocos productos finales de fermentación como gases, hidrógeno y dióxido de carbono; unos pocos ácidos; unos pocos alcoholes y una cetona. El proceso de fermentación más común produce como producto final ácido láctico. La producción de ácidos se pone de manifiesto con un indicador ácido-base, como el azul de bromotimol, cuyo viraje expresa el cambio de pH del medio. (MacFaddin, 2003)

- **Fundamento de la prueba de lecitinasa**

Esta prueba permite determinar la capacidad de los microorganismos para producir la enzima lecitinasa, evidenciada por la aparición de opacidad en agar yema de huevo. Es principalmente útil en la identificación de especies de *Clostridium*. Éste microorganismo produce una  $\alpha$ -toxina que es una lecitinasa, que fue denominada lecitinasa C, responsable de la acción de lecitinasa en agar yema de huevo y del halo de hemólisis en agar sangre.

La lecitinasa actúa sobre el componente lipoprotéico de la yema de huevo produciendo la hidrólisis de la lecitina que libera fósforo y colina y produce la precipitación de grasas



insolubles generando la opalescencia del medio. Un halo opaco rodea las colonias que crecen en medios que contienen yema de huevo. (MacFaddin, 2003)

La opalescencia se debe a una combinación de tres factores:

- a) Las grasas (diglicéridos) producidas por la degradación de la lecitina.
- b) Las grasas libres de la emulsión de la yema de huevo después de la degradación de la lecitina.
- c) Las proteínas insolubles en agua de la yema de huevo (vitelina y vitelenina) que precipitan las grasas libres. (MacFaddin, 2003)

### 2.3.3. Fundamento de los medios de cultivo

- **Fundamento del Agar *Bacteroides* Bilis Esculina (BBE)**

El Agar *Bacteroides* Bilis Esculina se utiliza como un medio de aislamiento primario para la identificación selectiva y presuntiva del grupo de *Bacteroides fragilis*. Contiene un hidrolizado enzimático de caseína altamente nutritivo, digerido papáico con harina de soja y hemina que ayuda al crecimiento de bacterias anaerobias exigentes como especies de *Bacteroides*. La bilis de buey y la gentamicina inhiben completamente microorganismos Gram negativos acompañantes de *Bacteroides*. La gentamicina, además, inhibe a microorganismos diferentes de *Bacteroides* que sean bilis-resistentes y esculina positivos. (Himedia Laboratories , 2011)

El medio es diferencial para *Bacteroides fragilis* por su contenido de esculina. Este microorganismo hidroliza la esculina en esculetina y dextrosa. La esculetina reacciona con citrato de amonio férrico para formar un complejo de color marrón-oscuro que se deposita alrededor de las colonias como un halo negro. (Himedia Laboratories , 2011)

- **Fundamento del Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) selectivo para *Clostridium perfringens***

El medio Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) es selectivo para sulfito-reductores. El Agar SPS contiene peptona como fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El extracto de levadura suministra complejo B lo que estimula el crecimiento de la bacteria. El citrato férrico y de sodio son indicadores de producción de H<sub>2</sub>S. El polisorbato 80 es un agente dispersante, el sulfato de polimixina B y la sulfadiazina son inhibidores de otros microorganismos de la flora acompañante de *Clostridium perfringens*, incluso otros reductores de sulfito.



*Clostridium*, por la acción sulfito-reductora, reduce el sulfito sódico a sulfuro, el cual reacciona con el hierro del citrato férrico que se manifiesta por la formación de un precipitado de sulfuro de hierro negro alrededor de la colonia. (Gonzalo, 2011)

- **Fundamento del Agar Cicloserina Cefoxitina Fructosa (CCFA) al 7% con sangre de cordero**

El Agar Cicloserina Cefoxitina Fructosa al 7% con sangre de cordero inhibe a la mayoría de los clostridios permitiendo el crecimiento exclusivo de *Clostridium difficile*. La sangre de cordero proporciona nutrientes y permite una buena formación de esporas y detección de una fluorescencia verde bajo luz UV de onda larga. La peptona y la fructosa suministran las fuentes necesarias de nitrógeno y carbono. Los fosfatos mantienen el pH. La cicloserina y cefoxitina son agentes selectivos para suprimir las bacterias acompañantes. (Gonzalo, 2011)

## 2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para determinar la repetibilidad de los análisis se calculó la precisión intra- e inter- día siguiendo el método análisis de varianzas (ANOVA) y se expresó como porcentaje de coeficiente de variación (% CV).

Las pruebas de comparación de los recuentos microbianos (UFC/mL) entre individuos se realizaron mediante el método de análisis de varianzas (ANOVA) de un factor. La viabilidad microbiana de *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* de la suspensión bacteriana en función del tiempo (entre semanas) se determinó mediante comparación de los recuentos (UFC/mL) por t-test de una cola entre cada 2 periodos de tiempo ( $T_0-T_1$ ,  $T_1-T_2$ ,  $T_2-T_3$  y  $T_3-T_4$ ), con un nivel de confianza del 95%; es decir,  $\alpha = 0,05$ .

Los análisis fueron desarrollados utilizando los programas Microsoft Excel 2013 y STATA 10.0.



## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. GENERALIDADES DE LA CARACTERIZACIÓN BACTERIANA

Se trabajó con muestras fecales de tres individuos recolectadas durante tres días. Estas fueron suministradas por el personal del Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC “*Food, Nutrition and Health*”, quienes se encargaron de los procedimientos de recolección según las necesidades investigativas.

Las suspensiones bacterianas de las muestras individuales se cultivaron en los medios selectivos por triplicado, por el mismo laboratorista. En total, se obtuvieron nueve recuentos (UFC/mL) para cada microorganismo estudiado (*Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*) por individuo (Anexo N° 14) a partir de los cuales se realizó el análisis estadístico. Se efectuaron las pruebas bioquímicas para cada bacteria, cuyos resultados se expresan en la tabla N° 3.

De la mezcla de la materia fecal se realizaron las suspensiones bacterianas que se conservaron en congelación a -80 °C durante cinco semanas. Cada semana se cultivaron por triplicado en los medios selectivos. En total, se obtuvieron nueve recuentos (UFC/mL) por semana para cada uno de los microorganismos estudiados (Anexo N° 15) a partir de los cuales se realizó el análisis estadístico de la viabilidad bacteriana. Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas entre semanas se expresan en la tabla N° 4.

**Tabla N° 3.** Pruebas de identificación para *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* en la suspensión por individuo

	Individuo	SB/día	Fermentación de HC					Motilidad	Indol	Producción de H <sub>2</sub> S	Catalasa	Lecitinasa	Fluorescencia (Verde)
			Glucosa	Ramnosa	Ribosa	Sacarosa	Trehalosa						
<i>Bacteroides fragilis</i>	V <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		D <sub>2</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		D <sub>3</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
	V <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		D <sub>2</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		D <sub>3</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
	V <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		D <sub>2</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		D <sub>3</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
<i>Clostridium perfringens</i>	V <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		D <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		D <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
	V <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		D <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		D <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
	V <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		D <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		D <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...





	Individuo	SB/día	Fermentación de HC					Motilidad	Indol	Producción de H <sub>2</sub> S	Catalasa	Lecitinasa	Fluorescencia (Verde)
			Glucosa	Ramnosa	Ribosa	Sacarosa	Trehalosa						
<i>Clostridium difficile</i>	V <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		D <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		D <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
	V <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		D <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		D <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
	V <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		D <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		D <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+

+ prueba positiva

- prueba negativa

... prueba no aplicada

**Tabla N° 4.** Pruebas de identificación para *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* en la suspensión bacteriana entre semanas

	Semana	SB	Fermentación de HC					Motilidad	Indol	Producción de H <sub>2</sub> S	Catalasa	Lecitinasa	Fluorescencia (Verde)
			Glucosa	Ramnosa	Ribosa	Sacarosa	Trehalosa						
<i>Bacteroides fragilis</i>	T <sub>0</sub>	SB <sub>1</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		SB <sub>2</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		SB <sub>3</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
	T <sub>1</sub>	SB <sub>1</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		SB <sub>2</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		SB <sub>3</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
	T <sub>2</sub>	SB <sub>1</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		SB <sub>2</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		SB <sub>3</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
	T <sub>3</sub>	SB <sub>1</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		SB <sub>2</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		SB <sub>3</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
	T <sub>4</sub>	SB <sub>1</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		SB <sub>2</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...
		SB <sub>3</sub>	+	-	-	+	-	-	-	...	+	...	...



	Semana	SB	Fermentación de HC					Motilidad	Indol	Producción de H <sub>2</sub> S	Catalasa	Lecitinasa	Fluorescencia (Verde)
			Glucosa	Ramnosa	Ribosa	Sacarosa	Trehalosa						
<i>Clostridium perfringens</i>	T <sub>0</sub>	SB <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		SB <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		SB <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
	T <sub>1</sub>	SB <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		SB <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		SB <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
	T <sub>2</sub>	SB <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		SB <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		SB <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
	T <sub>3</sub>	SB <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		SB <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		SB <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
	T <sub>4</sub>	SB <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		SB <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...
		SB <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	-	-	+	-	+	...



	Semana	SB	Fermentación de HC					Motilidad	Indol	Producción de H <sub>2</sub> S	Catalasa	Lecitinasa	Fluorescencia (Verde)
			Glucosa	Ramnosa	Ribosa	Sacarosa	Trehalosa						
<i>Clostridium difficile</i>	T <sub>0</sub>	SB <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		SB <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		SB <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
	T <sub>1</sub>	SB <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		SB <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		SB <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
	T <sub>2</sub>	SB <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		SB <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		SB <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
	T <sub>3</sub>	SB <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		SB <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		SB <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
	T <sub>4</sub>	SB <sub>1</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		SB <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+
		SB <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	+	...	...	-	...	+

+ prueba positiva

- prueba negativa

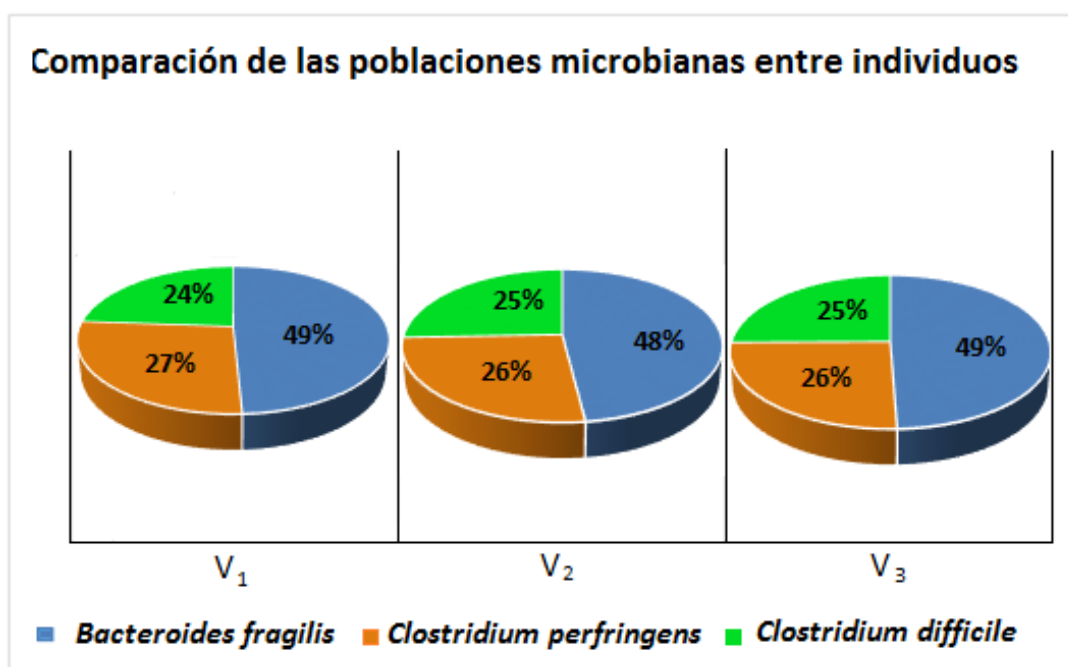
... prueba no aplicada

### 3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA FECAL ENTRE INDIVIDUOS

#### Comparación de las poblaciones microbianas

En este estudio se evaluó la presencia de tres especies anaerobias de la microbiota fecal: *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*. Se eligieron éstas por la mayor prevalencia de éstos en la microbiota fecal y su mayor facilidad de cultivo *in-vitro*.

La caracterización de la microbiota fecal en función de estas tres especies se realizó mediante la comparación de la prevalencia del recuento total de bacterias encontradas en las suspensiones bacterianas de cada individuo.



V<sub>1</sub>: Individuo 1. V<sub>2</sub>: Individuo 2. V<sub>3</sub>: Individuo 3

**Gráfico N° 1.** Comparación de las poblaciones microbianas entre individuos

Al comparar los recuentos bacterianos entre los tres individuos en materia fecal fresca, *Bacteroides fragilis* presentó el mayor porcentaje de la población bacteriana estudiada ( $49 \pm 0,8\%$ ), seguido por *Clostridium perfringens* ( $26 \pm 0,8\%$ ) y con el menor porcentaje, *Clostridium difficile* ( $25 \pm 0,8\%$ ).

Estas diferencias entre individuos por bacteria también fueron evaluadas mediante un análisis de varianzas. Para el recuento de *Bacteroides fragilis* no se observó una diferencia significativa entre los tres individuos ( $p = 0,068$ ). Por el contrario, para el



recuento de *Clostridium perfringens* sí se observó una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) al igual que *Clostridium difficile* ( $p = 0,0001$ ).

*Bacteroides* y *Clostridium* se incluyen dentro de los géneros de mayor prevalencia en la microbiota fecal. *Bacteroides* se presenta en mayor proporción, alcanzando recuentos comprendidos entre  $10^9$  -  $10^{12}$  UFC/g (Delgado, 2005) (Rodríguez, Gamboa, Rodríguez, & Vargas, 2006) (García, Fernández, & Paredes, 1997), lo que podría explicar que en éste estudio, *Bacteroides fragilis* representó el mayor porcentaje de la población bacteriana estudiada, en relación a las especies del género *Clostridium*.

El tipo de dieta condiciona el predominio de los diferentes grupos de bacterias que componen la microbiota intestinal y por tanto la microbiota fecal. Según el tipo de alimentos consumidos se origina una variación temporal en la composición de la microbiota de aproximadamente el 20% cada día. Así, con una dieta rica en polisacáridos predominará el género *Bacteroides* ya que es el principal microorganismo fermentador de carbohidratos a nivel intestinal; mientras que, con una dieta rica en grasas o proteínas y baja en polisacáridos predominará el género *Clostridium* (Icaza, 2013) (Salinas, 2013) (Gómez & Acero, 2011). A los individuos participantes se les proporcionó una dieta alta en carbohidratos y baja en grasas, lo que podría también explicar el predominio de *Bacteroides fragilis* con respecto a las especies del género *Clostridium*.

Se esperaría que los recuentos bacterianos (UFC/mL) de la microbiota fecal difiera de un individuo a otro e incluso de un día a otro en el mismo individuo, ya que estudios demuestran que ésta depende de características específicas de cada persona como factores genéticos, estado de salud, niveles de estrés, estado nutricional y consumo de antibióticos, así como de factores externos que incluyen carga microbiana del ambiente, tipo de dieta, etc. (Salinas, 2013)

Tomando en cuenta que se controló varios de los factores que influyen en la composición de la microbiota fecal como edad, tipo de dieta, estado de salud, estado nutricional y consumo de antibióticos de los individuos participantes en el estudio; la variación en los recuentos (UFC/mL) de *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* se podría explicar por la influencia de factores no controlables como genética, carga microbiana del ambiente y niveles de estrés. (Gómez & Acero, 2011) (Delgado, 2005) (Salinas, 2013)

Los recuentos bacterianos (UFC/mL) similares de *Bacteroides fragilis* encontrados entre los individuos participantes podría deberse a que éste microorganismo estuvo presente



en mayor cantidad dentro de las suspensiones bacterianas con respecto a *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*. Por lo tanto, así exista una diferencia grande entre recuentos de *Bacteroides* no se detectaría una variación estadísticamente significativa al trabajar con pocos datos. Pero, en el género *Clostridium* al presentar recuentos menores pequeñas variaciones en éstos pueden generar grandes diferencias estadísticas. Esto se expresó en un recuentos bacteriano diferente entre individuo.

### 3.3 VIABILIDAD MICROBIANA EN LA SUSPENSIÓN BACTERIANA ENTRE SEMANAS

Las suspensiones bacterianas elaboradas y conservadas bajo condiciones de almacenamiento estandarizadas, se cultivaron cada semana durante cinco semanas en medios selectivos para *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* con el objetivo de determinar la viabilidad bacteriana a través del tiempo.

Por un lado, los recuentos microbianos obtenidos de las suspensiones bacterianas de cada individuo en función del tiempo, es decir, durante las semanas  $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  y  $T_4$  fueron comparados porcentualmente y se observó una tendencia similar que en las muestras fecales frescas. *Bacteroides fragilis* presentó el mayor porcentaje de la población estudiada, con una valor que osciló entre 53-56% durante las cinco semanas, seguido por *Clostridium perfringens* con un porcentaje que osciló entre 23-25% y por último, *Clostridium difficile* con un porcentaje menor que osciló entre 22-23%.

El análisis de la viabilidad de las bacterias se efectuó mediante t-test de una cola, para lo cual se contó con 9 cultivos de cada bacteria por semana (3 días por triplicado). Este análisis no se realizó por análisis de varianzas porque el objetivo fue evaluar semana por semana un cambio en la viabilidad, es decir, una disminución en el recuento bacteriano. Por lo tanto, los recuentos obtenidos durante las cinco semanas se compararon para valorar si existía una diferencia significativa entre semanas: *A* con *B*, *B* con *C*, *C* con *D* y *D* con *E*, donde cada punto *A*, *B*, *C*, *D* y *E* correspondía al recuento medio obtenido en la semana  $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  y  $T_4$ , respectivamente (tabla N° 5).

**Tabla N° 5.** Resultados del t-test: Recuentos microbianos (UFC/mL) de las suspensiones bacterianas entre semanas.

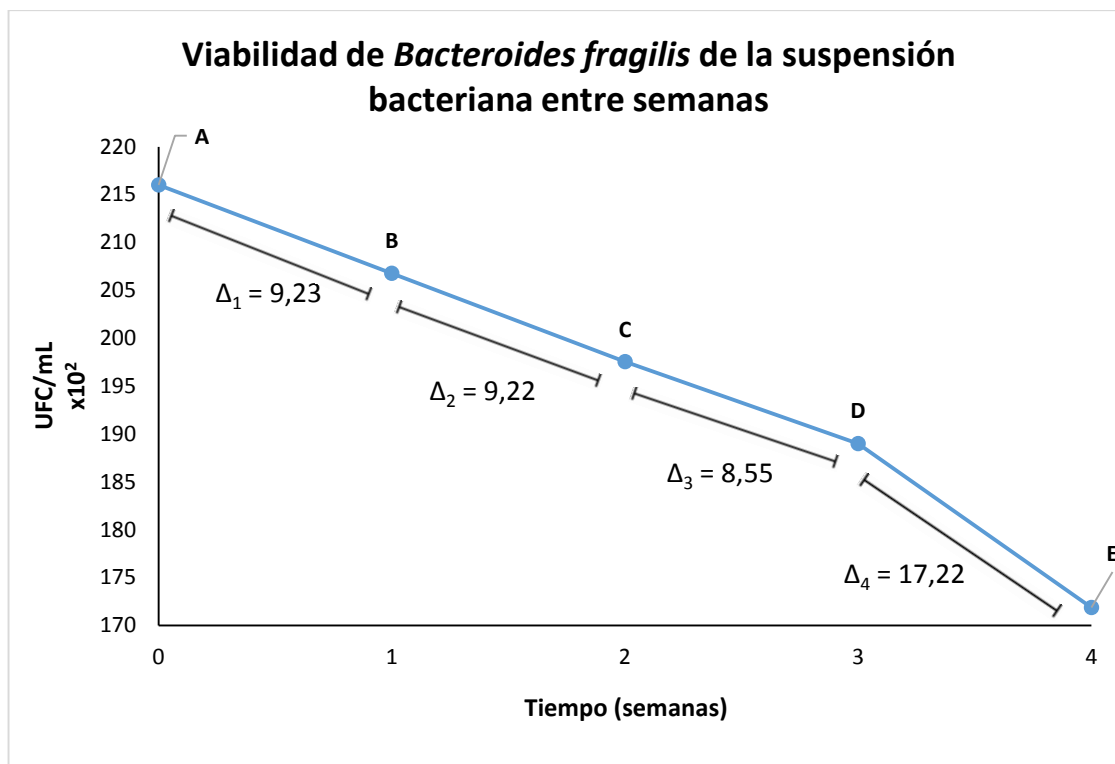
	Semana	Recuento medio (x10 <sup>2</sup> UFC/mL)	DE	Min	Max	I.C 95%	Valor de P
<i>Bacteroides fragilis</i>	T <sub>0</sub>	216	4,97	209	222	212,17 - 219,82	0,0002*
	T <sub>1</sub>	206,77	3,80	202	213	203,85 - 209,69	
	T <sub>1</sub>	206,77	3,80	202	213	203,85 - 209,69	< 0,001*
	T <sub>2</sub>	197,55	3,35	193	203	194,97 - 200,13	
	T <sub>2</sub>	197,55	3,35	193	203	194,97 - 200,13	< 0,001*
	T <sub>3</sub>	189	2,5	186	193	187,07 - 190,92	
	T <sub>3</sub>	189	2,5	186	193	187,07 - 190,92	< 0,001*
	T <sub>4</sub>	171,88	2,71	168	176	169,80 - 173,97	
<i>Clostridium perfringens</i>	T <sub>0</sub>	91,77	5,60	85	101	87,46 - 96,08	0,1424
	T <sub>1</sub>	89	5,02	83	96	85,13 - 92,86	
	T <sub>1</sub>	89	5,02	83	96	85,13 - 92,86	0,1208
	T <sub>2</sub>	86	5,43	78	94	81,82 - 90,17	
	T <sub>2</sub>	86	5,43	78	94	81,82 - 90,17	0,1273
	T <sub>3</sub>	83	5,33	77	93	78,89 - 87,10	
	T <sub>3</sub>	83	5,33	77	93	78,89 - 87,10	0,1661
	T <sub>4</sub>	80,66	4,52	75	88	77,18 - 84,14	
<i>Clostridium difficile</i>	T <sub>0</sub>	86,88	6,03	79	94	82,25 - 91,52	0,1238
	T <sub>1</sub>	83,44	6,14	76	91	78,71 - 88,16	
	T <sub>1</sub>	83,44	6,14	76	91	78,71 - 88,16	0,2880
	T <sub>2</sub>	81,66	7,03	73	90	76,25 - 87,07	
	T <sub>2</sub>	81,66	7,03	73	90	76,25 - 87,07	0,0999
	T <sub>3</sub>	77,66	5,56	70	85	73,38 - 81,94	
	T <sub>3</sub>	77,66	5,56	70	85	73,38 - 81,94	0,0701
	T <sub>4</sub>	73,66	5,36	67	82	69,54 - 77,78	

DE: desviación estándar. Min: recuento mínimo. Max: recuento máximo. I.C: índice de confianza.

\*: diferencia estadísticamente significativa.

Los resultados se expresaron gráficamente y la diferencia de UFC/mL de un punto a otro se representó como  $\Delta$  (Gráfico N° 2, N° 3 y N° 4).

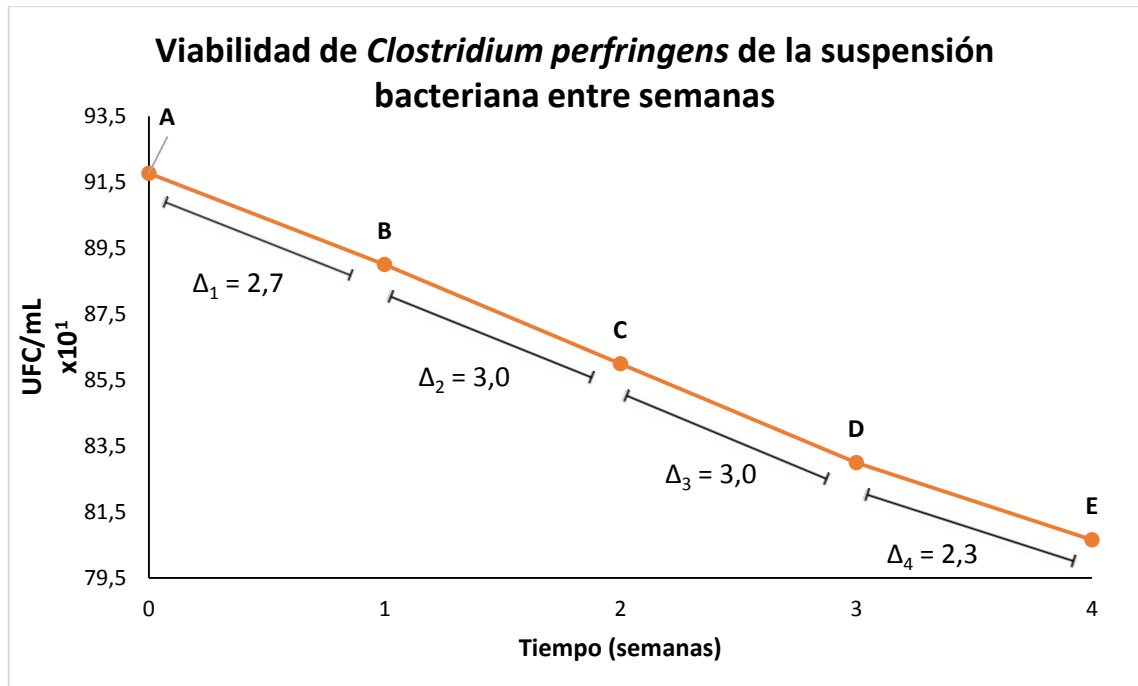




**A:** a  $T_0$  recuento de  $216,0 \times 10^2$  UFC/mL... **B:** a  $T_1$  recuento de  $206,8 \times 10^2$  UFC/mL... **C:** a  $T_2$  recuento de  $197,6 \times 10^2$  UFC/mL. **D:** a  $T_3$  recuento de  $189,0 \times 10^2$  UFC/mL. **E:** a  $T_4$  recuento de  $171,9 \times 10^2$  UFC/mL.

**Gráfico N° 2.** Viabilidad de *Bacteroides fragilis* de la suspensión bacteriana entre semana.

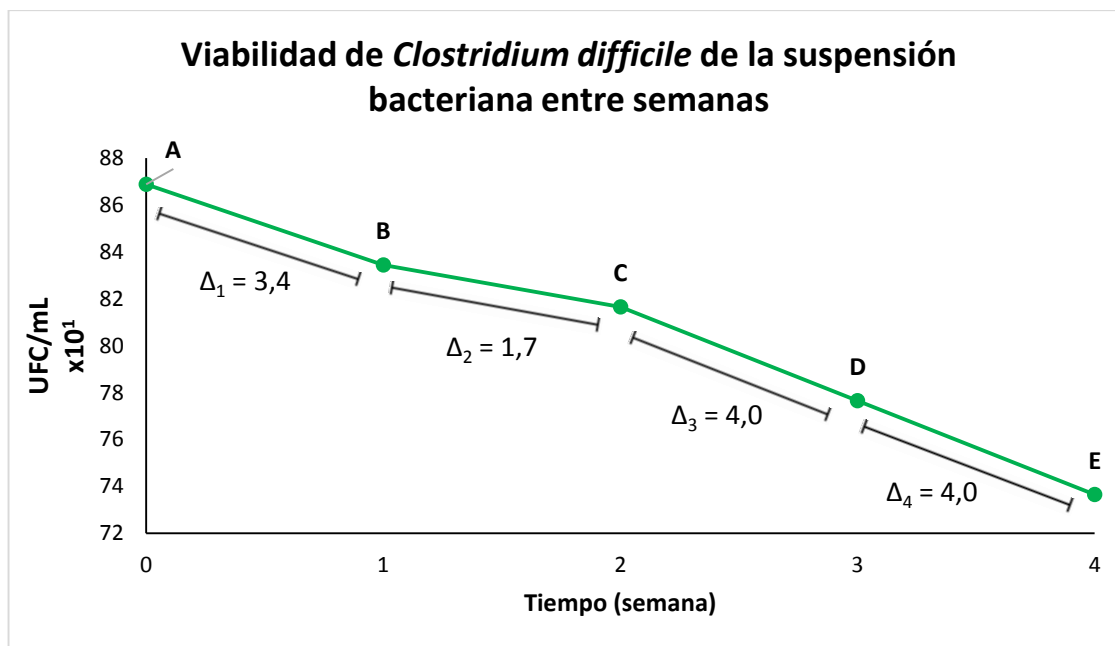
En el gráfico N° 2 se observa que la viabilidad de *Bacteroides fragilis* de la suspensión bacteriana presentó una tendencia lineal a la disminución más o menos homogénea durante las cuatro primeras semanas (punto A, B, C y D), con un descenso promedio de  $9 \pm 0,4 \times 10^2$  UFC/mL ( $\Delta_{1,2,3}$ ). Sin embargo, a la quinta semana (punto E) se observó un descenso brusco del número de bacterias viables, con relación a la cuarta, de  $17,1 \times 10^2$  UFC/mL ( $\Delta_4$ ). Al evaluar este cambio estadísticamente (t-test), se observaron diferencias significativas en los recuentos bacterianos entre los puntos A con B ( $p = 0,0002$ ), B con C ( $p < 0,001$ ), C con D ( $p < 0,001$ ) y D con E ( $p < 0,001$ ).



**A:** a  $T_0$  recuento de  $91,8 \times 10^1$  UFC/mL. **B:** a  $T_1$  recuento de  $89,0 \times 10^1$  UFC/mL. **C:** a  $T_2$  recuento de  $86,0 \times 10^1$  UFC/mL. **D:** a  $T_3$  recuento de  $83,0 \times 10^1$  UFC/mL. **E:** a  $T_4$  recuento de  $80,7 \times 10^1$  UFC/mL.

**Gráfico N° 3.** Viabilidad de *Clostridium perfringens* de la suspensión bacteriana entre semana.

En el gráfico N° 3 se expresa que la viabilidad de *Clostridium perfringens* de la suspensión bacteriana presentó una tendencia lineal a la disminución más o menos homogénea durante las cinco semanas (punto A, B, C, D y E), con un descenso promedio de  $2,8 \pm 0,3 \times 10^1$  UFC/mL ( $\Delta_{1, 2, 3, 4}$ ). Al evaluar este cambio estadísticamente (t-test), se no observaron diferencias significativas en los recuentos bacterianos entre los puntos A con B ( $p = 0,142$ ), B con C ( $p = 0,120$ ), C con D ( $p = 0,127$ ) y D con E ( $p = 0,166$ ).



**A:** a  $T_0$  recuento  $86,9 \times 10^1$  UFC/mL. **B:** a  $T_1$  recuento  $83,4 \times 10^1$  UFC/mL. **C:** a  $T_2$  recuento  $81,7 \times 10^1$  UFC/mL. **D:** a  $T_3$  recuento  $77,7 \times 10^1$  UFC/mL. **E:** a  $T_4$  recuento  $73,7 \times 10^1$  UFC/mL.

**Gráfico N° 4.** Viabilidad de *Clostridium difficile* de la suspensión bacteriana entre semana.

En el gráfico N° 4 se aprecia que la viabilidad de *Clostridium difficile* de la suspensión bacteriana presentó una tendencia lineal a la disminución más o menos homogénea durante las cinco semanas (punto A, B, C, D y E), con un descenso promedio de  $3,3 \pm 1,1 \times 10^1$  UFC/mL ( $\Delta_{1,2,3,4}$ ). Al evaluar este cambio estadísticamente (t-test), no se observaron diferencias significativas en los recuentos bacterianos entre los puntos A con B ( $p = 0,123$ ), B con C ( $p = 0,288$ ), C con D ( $p = 0,099$ ) y D con E ( $p = 0,070$ ).

Los resultados obtenidos sugieren que la suspensión bacteriana de materia fecal elaborada a partir de una solución estandarizada y conservada bajo condiciones establecidas (conservación en congelación a  $-80^\circ\text{C}$  con glicerol al 25% como agente crioprotector) mantiene viables a las especies del género *Clostridium* pero no a *Bacteroides fragilis*.

Las bacterias almacenadas tienden a perder viabilidad, en menor o mayor grado, durante los procesos de almacenamiento (Del Puerto, y otros, 2009) (Pérez & Sosa, 2010). De los factores que podrían influir en los niveles de viabilidad de microorganismos en métodos de preservación en congelación se tienen varios como: temperatura de congelación, condiciones propias de los microorganismos, eficacia y concentración del agente crioprotector. (Arencibia, Rosario, & Gámez, 2008)



La temperatura de congelación para la conservación de una suspensión celular debe ser lo más baja posible ya que existe una gran concentración de solutos que provoca la disminución en el punto crioscópico. A temperaturas mayores a  $-70^{\circ}\text{C}$  se produce frecuentes congelaciones y descongelaciones que generan daño celular (Arencibia, Rosario, & Gámez, 2008) (Jiménez, 2009) (Pérez & Sosa, 2010). Por lo tanto se asume que la temperatura a la que se conservó la suspensión ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) fue la adecuada y no influyó en la disminución de la viabilidad de *Bacteroides fragilis*.

El tipo de crioprotector a emplear está en función del microorganismo que se desea preservar y hay pocos estudios que exponen el uso adecuado de estos agentes para una especie bacteriana en específico (Sánchez & Corrales, 2005). Considerando que se desconoce muchas especies de bacterias de la flora intestinal y fecal (Salinas, 2013), no se puede establecer qué tipo de crioprotector va a proteger a la mayor cantidad de microorganismos presentes en una suspensión de la microbiota fecal. La compañía New England Biolabs (NEB) propone el uso de 50% de glicerol cuando se conserva a  $-70^{\circ}\text{C}$ , mientras que la Colección de Cultivos Americana (ATCC) utiliza preferentemente el dimetil sulfóxido como criopreservante (Pérez & Sosa, 2010), por presentar más datos de efectividad reportados (Morales, y otros, 2010). En este estudio se observa que el glicerol al 25% usado como agente crioprotector podría haber favorecido la sobrevivencia del género *Clostridium* y no la de *Bacteroides*.

Uno de los factores más importantes que influyen en la viabilidad de los microorganismos en la conservación mediante congelación podría ser la diferencia estructural y funcional que existe entre los diferentes tipos de bacterias.

Cuando se conservan células por métodos de congelación y éstas se encuentran en el inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento se ha observado mayor viabilidad de los microorganismos, sobre todo de aquellos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, como es el caso del género *Clostridium* que son microorganismos pleomórficos que producen esporas, lo que no ocurre con *Bacteroides*. Esto podría explicar la disminución de la viabilidad de *Bacteroides* y el mantenimiento de la viabilidad de *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*. (Arencibia, Rosario, & Gámez, 2008).

Además, el género *Clostridium*, especialmente *Clostridium perfringens*, puede tolerar hasta un 5% de oxígeno, mientras que *Bacteroides* requiere de un ambiente anaerobio estricto para su crecimiento (Pascual, 2005), efecto que también pudo influir en la diferente viabilidad de cada microorganismo.



Es importante considerar que la congelación genera un estado de estrés de la bacteria que modifica la actividad bioquímica de manera transitoria. Cuando el microorganismo se estabiliza y se elimina la causa de estrés, los procesos moleculares son recuperados en su totalidad. Sin embargo, es necesario que este estrés sea mitigado en el momento de la descongelación en medios líquido que faciliten el intercambio molecular iónico y así se restituya la actividad bioquímica de la membrana celular rápidamente (Sánchez & Corrales, 2005). Al no realizar una pre-incubación en un medio líquido se retarda el tiempo de aparición de las colonias en medios sólidos o incluso se podría inhibir la recuperación bacteriana (Pérez & Sosa, 2010).

De los resultados obtenidos, se podría deducir que la falta de pre-incubación en un medio líquido descrito anteriormente afectó en mayor medida a *Bacteroides fragilis* porque mostró disminución en su viabilidad durante las cinco semanas; pero *Clostridium* se mantuvo viable de una semana a otra. Esto se podría explicar por la diferente capacidad de adaptación que se presenta entre los dos géneros, ya que estudios han demostrado que las bacterias Gram negativas como *Bacteroides* presentan más cambios moleculares de adecuación estructural que las bacterias Gram positivas como *Clostridium* para adaptarse al ambiente de estrés que genera la congelación. Este fenómeno está relacionado con la conformación química de su membrana y con otro tipo de mensajes o señalizaciones que generan cambios en algunas de las reacciones bioquímicas características y que se recuperan cuando se realiza la reactivación metabólica bacteriana en medios líquidos (Sánchez & Corrales, 2005) (Jiménez, 2009).

### 3.3. MEDICIÓN DE LA VARIABILIDAD DE LOS ANÁLISIS

La variabilidad analítica se evaluó mediante el cálculo de la precisión intra- e inter-día expresada como porcentaje de coeficiente de variación (% CV). Este análisis se realizó previo al estudio de la viabilidad microbiana de la suspensión bacteriana y permitió establecer el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento experimental bajo las mismas condiciones de medición. Para ésta evaluación se consideró que como punto de corte, para recuentos superiores a 1000 UFC/mL, el coeficiente de variación debe ser inferior o igual al 15%. (Menéndez, 2013)

La precisión intra-día permitió evaluar la repetibilidad del proceso analítico considerando como fuentes de variación la toma, conservación y transporte de la muestra, y especialmente el proceso de cultivo de la misma en el laboratorio. La precisión inter-día evaluó la homogeneidad de la muestra en el mismo individuo durante los tres días de recolección, es decir, la variabilidad intrínseca del individuo así como también la toma, conservación y transporte de la muestra.



Para todos los individuos ( $V_1$ ,  $V_2$  y  $V_3$ ) el coeficiente de variación para los recuentos de *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* en el mismo día y entre días resultó menor al 15% como se muestra en la tabla N° 6. Esto indicaría que no se observó una variación considerable ni del analista en el proceso de cultivo de las muestras ni de los procedimientos para la recolección, transporte y almacenamiento de la misma. Además, se constató satisfactoriamente que la variación en la composición de la muestra con respecto a *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* fue baja para un mismo individuo durante los tres días de recolección de la materia fecal. Esto podría significar que el tratamiento específico al que fueron sometidos los individuos donantes de las muestras fue efectivo para evitar variaciones significativas de la composición de la microbiota fecal individual.

**Tabla N° 6.** Precisión intra- e inter-día expresado en porcentaje de coeficiente de variación (%CV).

Individuo	Microorganismo	Intra-día (% CV)	Inter-día (% CV)
$V_1$	<i>Bacteroides fragilis</i>	12,3	2,2
	<i>Clostridium perfringens</i>	5,0	5,2
	<i>Clostridium difficile</i>	7,0	5,3
$V_2$	<i>Bacteroides fragilis</i>	9,4	2,1
	<i>Clostridium perfringens</i>	7,2	5,4
	<i>Clostridium difficile</i>	5,5	5,2
$V_3$	<i>Bacteroides fragilis</i>	11,3	2,8
	<i>Clostridium perfringens</i>	2,5	5,3
	<i>Clostridium difficile</i>	3,3	5,9



## CONCLUSIONES

El procedimiento de análisis cumplió criterios establecidos para los parámetros estadísticos estipulados en repetibilidad.

De las tres poblaciones bacterianas estudiadas *Bacteroides fragilis* fue el predominante en la materia fecal por individuo ( $49 \pm 0,8\%$ ) seguido por *Clostridium perfringens* ( $26 \pm 0,8\%$ ) y por último, *Clostridium difficile* ( $25 \pm 0,8\%$ ). Una tendencia similar se observó en la mezcla de la materia fecal durante las cinco semanas de estudio. *Bacteroides fragilis* presentó un valor que osciló entre 53-56%, seguido por *Clostridium perfringens* con un porcentaje que osciló entre 23-25% y finalmente *Clostridium difficile* con un porcentaje menor que osciló entre 22-23%.

Se ha puesto de manifiesto que los recuentos (UFC/mL) de *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* presentaron diferencia significativa entre los individuos ( $p < 0,001$  y  $p = 0,0001$  respectivamente); mientras que, para los recuentos de *Bacteroides fragilis* no se observó diferencia significativa ( $p = 0,068$ ).

La suspensión bacteriana elaborada, a partir de muestras de materia fecal y una solución estandarizada de buffer de fosfatos y conservada bajo condiciones establecidas no logró mantener la viabilidad de *Bacteroides fragilis* a través del tiempo, pero sí mantuvo viables a *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* durante las cinco semanas de estudio.



## RECOMENDACIONES

En virtud del estudio realizado se recomienda:

- Analizar otras especies bacterianas, a más de las tres estudiadas, para obtener datos que permitan manifestar las diferencias esperadas en la composición de la microbiota fecal de un individuo a otro.
- Realizar estudios del comportamiento de las bacterias Gram negativas y Gram positivas en la suspensión bacteriana elaborada y conservada bajo las mismas condiciones de este estudio para establecer si influye o no la estructura morfológica en el mantenimiento de su viabilidad.
- Elegir un nuevo agente crioprotector como el dimetil sulfóxido o aumentar la concentración de glicerol a 50% como recomienda la compañía New England Biolabs (NEB), con el objetivo de analizar si existe una mejora en la viabilidad de los microorganismos en suspensión.
- Realizar la reactivación de la actividad metabólica de las bacterias en medios líquidos como el caldo a base de tioglicolato o infusión cerebro corazón (BHI) para facilitar la recuperación de colonias en medios sólidos, especialmente de *Bacteroides fragilis*.
- Prolongar el tiempo de estudio, más allá de las cinco semanas para el grupo de *Clostridium* en la suspensión bacteriana y establecer su viabilidad en el tiempo.





## BIBLIOGRAFÍA

- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires : Médica Panamericana.
- Álvarez, G. (2013). Aplicaciones clínicas del empleo de probióticos en pediatría. *Nutrición Hospitalaria*, 28(3), 564 - 574.
- Arencibia, D., Rosario, L., & Gámez, R. (2008). Métodos generales de conservación de microorganismos. *VacciMonitor*, 1 - 14.
- Becton Dickinson. (Febrero de 2005). *BD Clostridium Difficile Agar con 7% de Sangre* . Obtenido de <http://www.bd.com/europe/regulatory/assets/ifu/hb/ce/pa/es-pa-254406.pdf>
- Bouza , E., Peláez , T., & Catalán , P. (20 de Octubre de 2001). *Hospital General Universitario Gregorio Marañón*. Obtenido de Enfermedad asociada a Clostridium difficile: [http://idd00pgh.eresmas.net/guidelines/Inf\\_Clostr\\_Diff.pdf](http://idd00pgh.eresmas.net/guidelines/Inf_Clostr_Diff.pdf)
- Del Puerto, C., Iglesias, E., Morales, T., Baños, N., Nocedo, M., Carnota, G., & Martínez, R. (2009). Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del instituto Finlay. *Scielo*, XVIII(1), 20 - 24.
- Delgado, S. (2005). *Universidad de Oviedo*. Obtenido de Microbiota intestinal humana: Análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas.: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/5220/1/TESIS%20Susana%20Delgado.pdf>
- Devaraj, S., Hemarajata, P., & Versalovic, J. (2013). La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: Implicaciones con la obesidad y la diabetes. *Nutrición Hospitalaria*, XLVII(2).
- Engelkirk, P., & Duben-Engelkirk, J. (2008). *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.
- Fernández, K. (Diciembre de 2014). *Pontificia Universidad Javeriana*. Obtenido de Bacterias probióticas presentes en la microbiota fecal y su capacidad para reducir la infección in-vitro por Rotavirus: <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/15428/1/FernandezDuarteKarenPrunella2014.pdf>



- García, P., Fernández, M., & Paredes, F. (1997). *Microbiología Clínica Aplicada*. Madrid: Díaz de Santos S.A.
- Gómez, M., & Acero, F. (2011). Composición y funciones de la flora bacteriana intestinal. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, XX(2), 75 -82. Obtenido de <http://www.summaremeis.com/images/productos/digexcel/evidencia/06-composicion-y-funciones-de-la-flora-bacteriana-intestinal.pdf>
- Gonzalo, V. (02 de Diciembre de 2011). *Prácticas en el Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria*. Obtenido de [http://facultadbiologia.usal.es/documentos/practicasempr/MemoriasPracEmpresas/CNTA\\_09\\_VeronicaGonzalo.pdf](http://facultadbiologia.usal.es/documentos/practicasempr/MemoriasPracEmpresas/CNTA_09_VeronicaGonzalo.pdf)
- Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*.
- Guarner, F., & Malagelada, J. (2003). La flora bacteriana del tracto digestivo. *Elsevier*, XXVII(1), 1 - 5.
- Himedia Laboratories . (2011). *Bacteroides Bile Esculin Agar Base (BBE)*. Obtenido de <http://himedialabs.com/TD/M805.pdf>
- Icaza, M. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, LXXVIII(4).
- Ingraham , J., & Ingraham , C. (1998). *Introducción a la Microbiología*. Barcelona: Reverté S.A.
- Jiménez, R. (19 de Marzo de 2009). *Universidad Autónoma Metropolitana IZTAPALAPA*. Obtenido de Construcción de un modelo de colon proximal humano para el estudio de prebióticos: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI14824.pdf>
- Kau, A., Ahrn, P., Griffin, N., Goodman, A., & Gordon, J. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 327 - 336.
- Kelly, C., & LaMont, T. (2008). *IntraMed*. Obtenido de Clostridium difficile: <http://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=57005&uid=&fuente=>
- Kim, B.-S., Nam, J., & Cerniglia, C. (2011). In vitro culture conditions for maintaining a complex population of human gastrointestinal tract microbiota. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1 - 10.



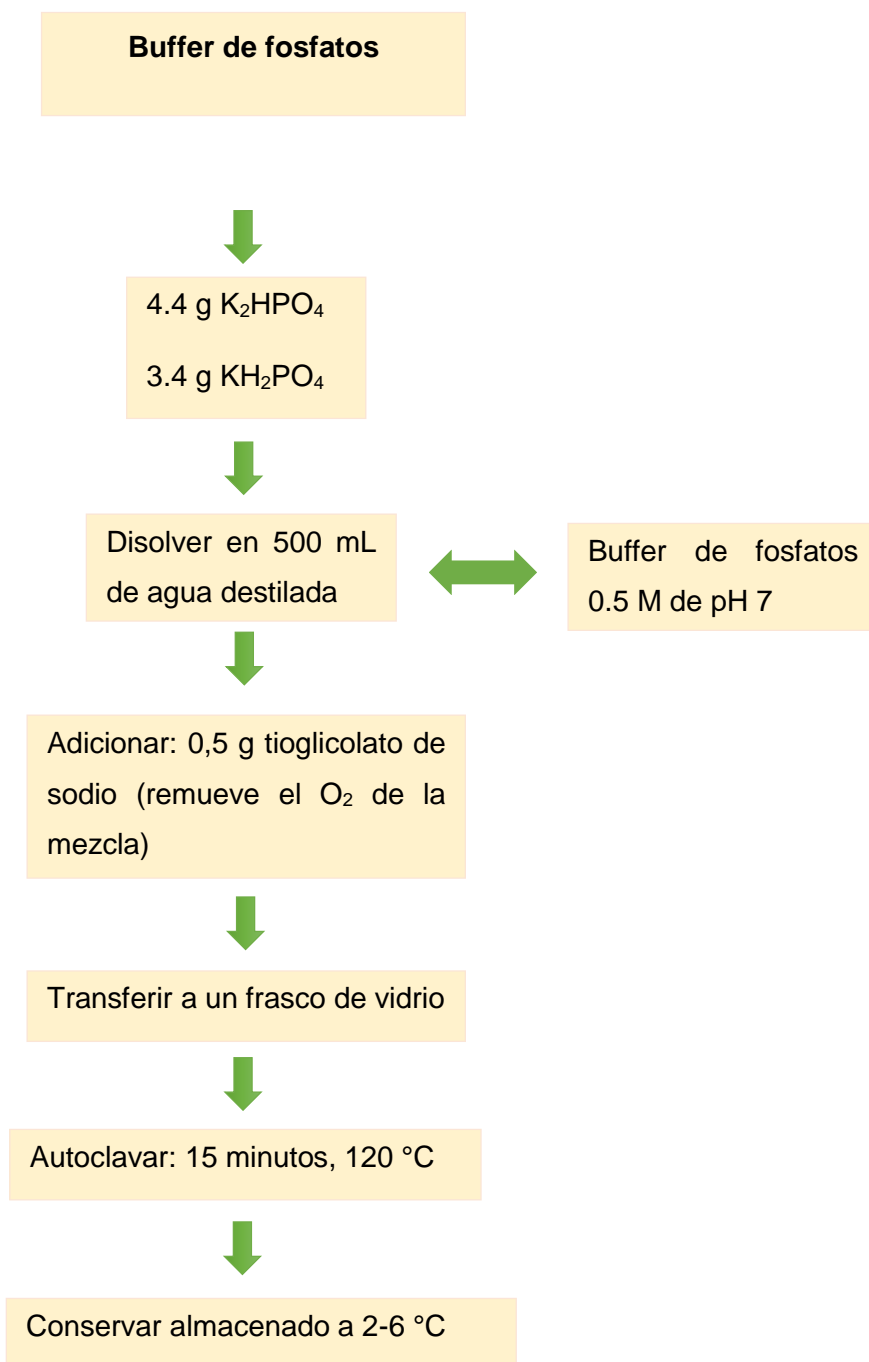
- Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico microbiologico: Texto y atlas en color*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Lozupone, C., Stombaugh, J., Gordom, J., Jansson, J., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 220 - 230.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Madrid: Médica Panamericana.
- Mellado, E., Jos, A., Moreno, M. I., & Camean, A. M. (2012). *Importancia de la microbiota del tracto gastrointestinal en toxicología alimentaria: Toxicología alimentaria*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Menéndez, A. (Junio de 2013). *Universidad de Oviedo*. Obtenido de Validación y cálculo de incertidumbre para la determinación de microorganismos indicadores, mediante microbiología clásica y NMP automatizado, en matrices cárnicas: [http://dspace.sheol.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17940/6/TFM\\_AlejandraVMenendez.pdf](http://dspace.sheol.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17940/6/TFM_AlejandraVMenendez.pdf)
- Morales, Y., Duque, E., Rodríguez, O., Matínez, R., Pérez, R., Muñoz, J., & De la Torre, J. (2010). Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Bio Tecnología*, XIV(2), 11 - 29.
- Noriega, M. J. (18 de Mayo de 2011). Obtenido de Fisiología del aparato digestivo: Digestión y absorción: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-humana-2011-g367/material-de-clase/bloque-tematico-5.-fisiologia-del-aparato/tema-6.-digestion-y-absorcion/tema-6.-digestion-y-absorcion>
- Oxoid . (20 de Enero de 2015). *AnaeroGen*. Obtenido de [http://www.analisisavanzados.com/modules/mod\\_tecdata/Anaerogen\\_AN0035A%20AN0025A\\_spanish.pdf](http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/Anaerogen_AN0035A%20AN0025A_spanish.pdf)
- Pascual, M. (2005). *Enfermedades de origen alimentario: su prevención*. Madrid: Díaz de Santos.
- Pérez, D., & Sosa, Á. (2010). Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de Escherichia coli K12 de uso frecuente en biotecnología. *VacciMonitor*, XIX(2), 11 - 17.
- Prats, G. (2006). *Microbiología Clínica*. Madrid: Médica Panamericana.
- Price, P., & Frey, K. (2003). *Microbiology for surgical technologists*. Estados Unidos: Cengage Learning.



- Rodríguez, E., Gamboa, M., Rodríguez, C., & Vargas, P. (2006). Grupo *Bacteroides fragilis* en heces humanas no diarreicas y su sensibilidad antimicrobiana. *Revista española de Quimioterapia*, XIX(4), 357 - 362.
- Sáez, L. R. (2008). *Tratamiento de las enfermedades digestivas*. Madrid: Médica Panamericana.
- Salinas, B. (2 de Agosto de 2013). Microbiota intestinal: Clave de la salud. *Scielo*, XVII(2), 3 - 4. Obtenido de Microbiota Intestinal: Clave de la Salud: <http://www.scielo.org.ve/pdf/s/v17n2/art02.pdf>
- Sánchez, L., & Corrales, L. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *NOVA*, III(4).
- Sanz, Y., Collado, M., Haros, M., & Dalmau, J. (2004). Funciones metabólico - nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: Probióticos y prebióticos. *Acta Pediátrica Española*, LXII(11), 30 - 36.
- Segarra, E. (2006). *Fisiología de los aparatos y sistemas*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Silva, M. d., García, M. J., Desongles, J., & Ponce, E. (2006). *Técnico especialista en laboratorio del servicio Gallego de salud*. España: MAD-Eduforma.
- Thompson, O., Maldonado, J., & Gill, A. (2004). La microbiota intestinal en el niño y la influencia de la dieta sobre su composición. *Alimentación, Nutrición y Salud*, XI(2), 37 - 48.
- Torres, M. (02 de Junio de 2015). Obtenido de Relación hiesped - parassito: Flora humana normal: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2013.pdf>

## ANEXOS

### Anexo N° 1. Elaboración del buffer de fosfatos





**Anexo N° 2. Medios selectivos de cultivo**

**2.1. AGAR BACTEROIDES BILIS ESCULINA (BBE)**

- **Formulación g/L**

**Tabla A-1.** Composición del agar BBE

Hidrolizado enzimático de caseína	15 g
Digerido papáico y harina de soya	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Bilis de buey	20 g
Esculina	1 g
Citrato de amonio férrico	0,5 g
Hemina	0,01 g
Vitamina K <sub>1</sub>	0,01 g
Agar	15 g
pH final 7± 0,2	

- **Método de preparación**

1. Suspender 61,52 g en 1000 mL de agua destilada.
2. Calentar a ebullición para disolver el medio completamente

- **Método de esterilización**

Autoclave: 121 °C de calor húmedo, 15 lb de presión, 15 minutos. Enfriar a 45 - 50 °C y añadir asépticamente dos viales Bacteroides Suplemento Selectivo de Gentamicina, rehidratando el contenido.

- **Fraccionamiento**

En condiciones asépticas, verter de 15 a 20 mL de medio en cajas monopetri estériles procurando que la altura del agar en la caja alcance 4 mm, dejar solidificar y tapar.

- **Inoculación**

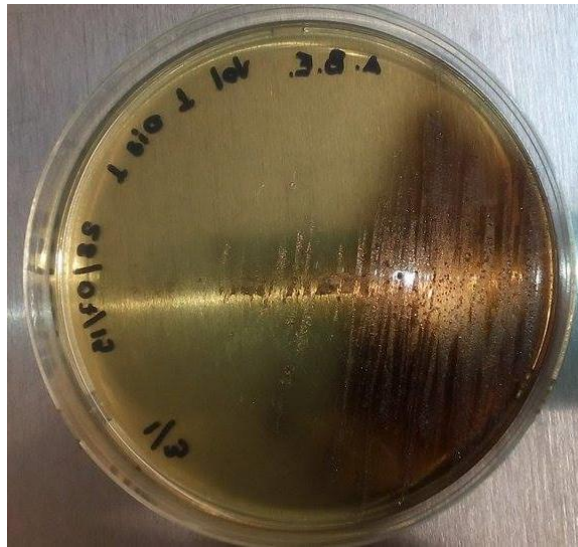
Siembra en estría para recuento semicuantitativo de colonias (Anexo N° 4)

- **Incubación**

En anaerobiosis a 37°C, 48 horas. (Himedia Laboratories , 2011)

- **Interpretación**

Colonias con halo negro que se depositan por la formación del complejo.



**Figura A-1.** Colonias de *Bacteroides fragilis* en Agar BBE

Fuente: (Registro de laboratorio)

- **Características del medio**

El color y la claridad del medio preparado: Medio color ámbar, gel transparente o ligeramente opalescente con un tinte azulado en las placas de Petri.

- **Almacenamiento**

Medio deshidratado: < a 30 °C.

Medio preparado: 2-6 °C. (Himedia Laboratories , 2011)



## 2.2. AGAR SULFITO POLIMIXINA SULFADIAZINA (SPS) SELECTIVO PARA *Clostridium perfringens*

- **Formulación g/L**

**Tabla A-2.** Composición del agar SPS

Tripona	15 g
Extracto de levadura	10 g
Citrato férrico	0,5 g
Sulfito de sodio	0,5 g
Tioglicolato de sodio	0,1 g
Polisorbato 80	0,05 g
Sulfadiazina	0,12 g
Sulfato de polimixina B	0,01 g
Agar	15 g
pH final $7 \pm 0,2$	

- **Método de preparación**

1. Suspender 40 g del polvo en 1 L de agua destilada, mezclar a fondo.
2. Calentar agitando constantemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo.

- **Método de esterilización**

Autoclave: 121 °C de calor húmedo, 15 lb de presión, 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C.

- **Fraccionamiento**

En condiciones asépticas, verter de 15 a 20 mL de medio en cajas monopetri estériles procurando que la altura del agar en la caja alcance 4 mm, dejar solidificar y tapar.

- **Inoculación**

Siembra en estría para recuento semicuantitativo de colonias (Anexo N° 4)

- **Incubación**

En anaerobiosis a 46 °C, 48 horas.



- **Interpretación**

Se manifiesta por la formación de un precipitado de sulfuro de hierro negro alrededor de la colonia. (Gonzalo, 2011)



**Figura A-2.** Colonias de *Clostridium perfringens* en Agar SPS

Fuente: (Registro de laboratorio)

- **Características del medio**

Medio deshidratado: Beige, de libre fluidez, homogéneo.

Medio preparado: Claro a ámbar, ligeramente opalescente.

- **Almacenamiento**

Medio deshidratado: < a 30 °C.

Medio preparado: 2-6 °C. (Gonzalo, 2011)



### 2.3. AGAR CICLOSERINA CEFOXITINA FRUCTOSA (CCFA) AL 7% CON SANGRE DE CORDERO

- **Formulación g/L**

**Tabla A-3.** Composición del agar CCFA

Digerido péptico de tejido	32 g
Fructosa	6 g
Fosfato monopotásico	1 g
Fosfato disódico	5 g
Cloruro sódico	2 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Cicloserina	0,5 g
Cefoxitina	0,016 g
Agar	20 g
Sangre de carnero	7%
pH final 7,2± 0,3	

- **Método de preparación**

1. Pesar los componentes de la formulación (excepto los antibióticos y la sangre de cordero), suspender en 1 L de agua destilada, mezclar a fondo.
2. Calentar agitando constantemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo.

- **Método de esterilización**

Autoclave: 121 °C de calor húmedo, 15 lb de presión, 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C y añadir asépticamente los antibióticos y la sangre de cordero.

- **Fraccionamiento**

En condiciones asépticas, verter de 15 a 20 mL de medio en cajas monopetri estériles procurando que la altura del agar en la caja alcance 4 mm, dejar solidificar y tapar.

- **Inoculación**

Siembra en estría para recuento semicuantitativo de colonias (Anexo. N° 4).

- **Incubación**

En anaerobiosis a 37°C, 48 horas.

- **Interpretación**

Después de 48-72 h de incubación, *Clostridium difficile* aparecerá en forma de colonias de color gris-blanco, con un aspecto de vidrio molido y un borde ligeramente filamentososo, pero sin señales de beta-hemólisis. Los cultivos que han crecido bien presentan un olor característico “similar al establo”, causado por la acumulación de p-cresol. Examinar el crecimiento con una luz ultravioleta de onda larga para observar la fluorescencia verdosa, lo que se debe realizar dentro de una hora de haber retirado la muestra de la atmósfera anaerobia. Después de la exposición al aire, las colonias pueden volverse no viables rápidamente, lo que por lo general viene acompañado de una pérdida de fluorescencia. (Becton Dickinson, 2005)



**Figura A-3.** Colonias de *Clostridium difficile* en Agar CCFA

Fuente: (Registro de laboratorio)

- **Características del medio**

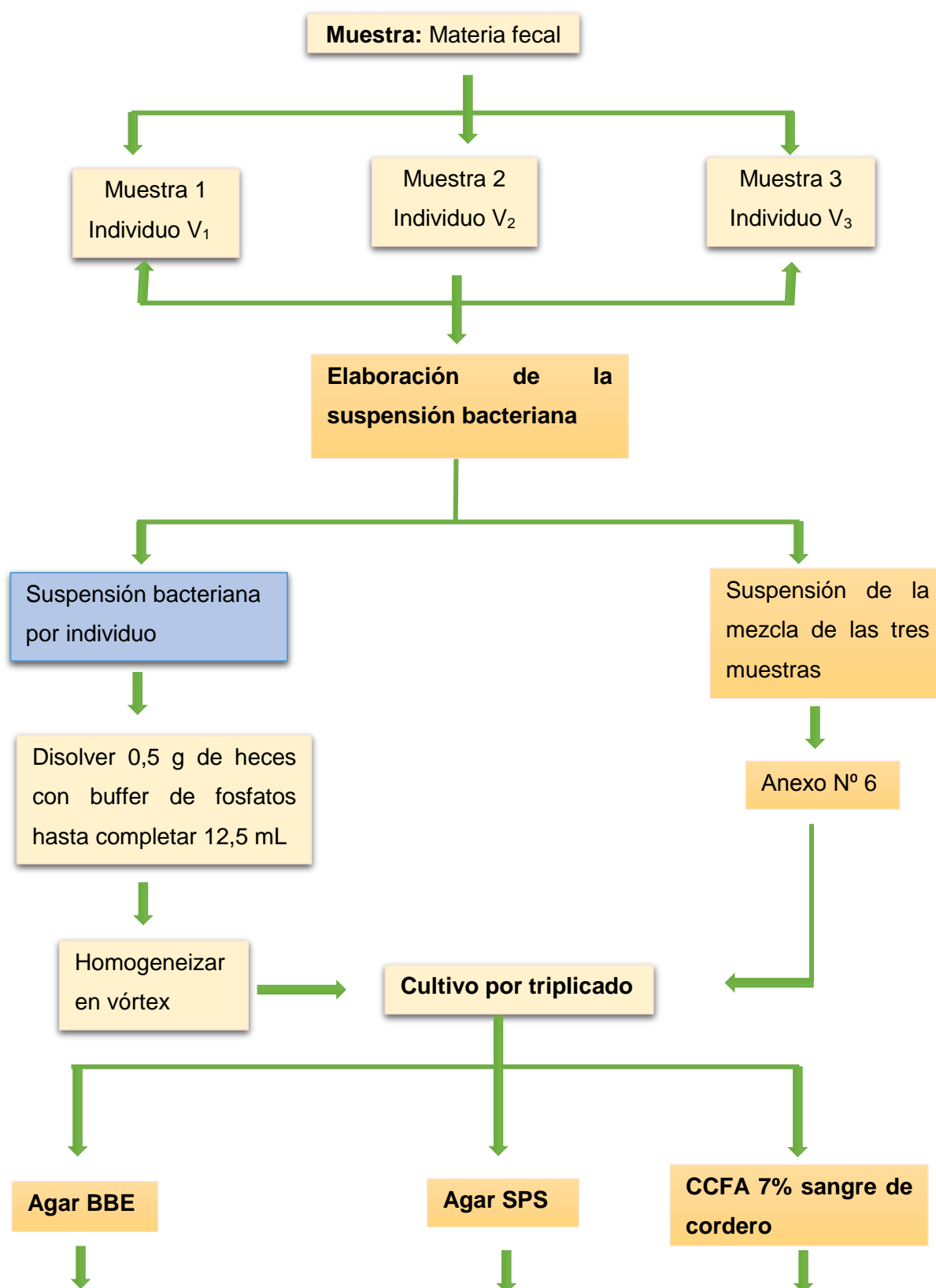
Medio deshidratado: Beige, de libre fluidez, homogéneo.

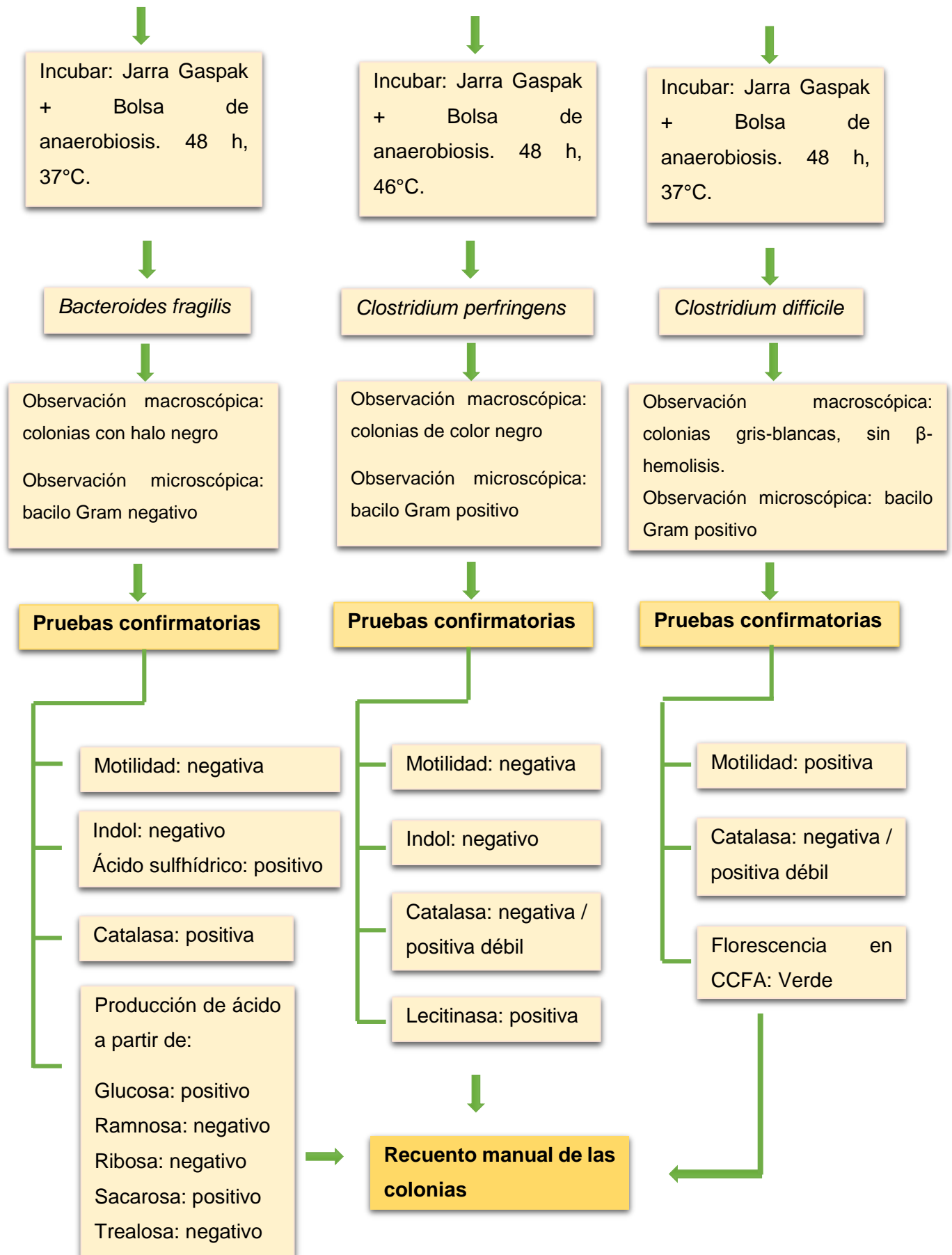
Medio preparado: Color rojo.

- **Almacenamiento**

Medio preparado: 2-8 °C

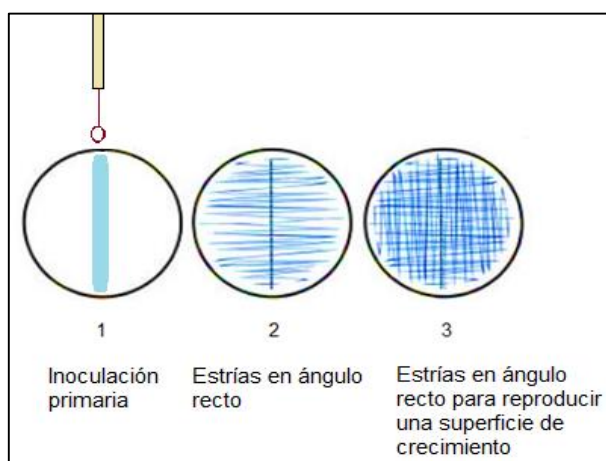
Anexo N° 3. Procesamiento de las muestras de materia fecal





**Anexo N° 4.** Técnica de siembra en estría en agar para recuento semicuantitativo de colonias

1. Sumergir un asa bacteriológica redonda calibrada para contener 0,01 mL de líquido, en la muestra no centrifugada.
2. Inocular la muestra en la superficie del agar.
3. Retirar el asa con cuidado y se coloca el volumen completo sobre la superficie del agar haciendo una única estría a través del centro.
4. El inóculo se esparce en forma uniforme en ángulos rectos respecto a la primera estría.
5. Girar la placa 90° y esparcir el inóculo hasta cubrir la superficie completa.
6. Estimar el número de bacterias en la muestra mediante el recuento de colonias sobre la superficie del agar.
7. Elegir las placas que presenten un número de entre 30 y 300 colonias/placa.
8. Para el conteo, utilizar una cuenta colonias o realizar en forma manual con la ayuda de un marcador y sacar una media entre en el recuento de colonias contadas en cada placa.
9. El número de colonias contadas se debe multiplicar por 100 (se empleó el asa con calibración de 0,01) y así se determina las UFC/mL. (Koneman & Allen, 2008)



**Figura A-4.** Técnica de siembra en estría para recuento semicuantitativo de colonias

Fuente: (Koneman & Allen, 2008)



## Anexo N° 5. Incubación con bolsas para anaerobiosis

- **Fundamento las bolsas de anaerobiosis**

La bolsa de generación de atmósfera anaeróbica (AnaeroGen) consta de un sobre de reactivo que contiene carbonato inorgánico, carbón activado, ácido ascórbico (principio activo) y agua. Cuando se extrae el sobre de su envoltorio externo de aluminio, el oxígeno atmosférico de la jarra es rápidamente absorbido por el sobre, provocando la activación de éste. El sobre con reactivo activado y las muestras se colocan en el recipiente de incubación, y éste se sella. El sobre reduce rápidamente la concentración de oxígeno en el interior del recipiente. Al mismo tiempo, el carbonato inorgánico produce dióxido de carbono. Si se emplea según las instrucciones el sobre AnaeroGen produce una atmósfera anaerobia en 2,5 horas, con menos de 1,0% de oxígeno y con el 13% o más de dióxido de carbono en 24 horas. (Oxoid, 2015)

- **Componentes**

Cada caja contiene:

- 10 bolsas AnaeroGen de papel envueltas cada una en un sobre de aluminio.
- 1 hoja de instrucciones del producto.

Cada bolsa contiene:

- Carbonato inorgánico,
- Carbón activado,
- Ácido ascórbico (principio activo),
- Agua

- **Precauciones**

Tan pronto como la bolsa de papel AnaeroGen sea expuesta al aire se inicia la reacción. Es por tanto, esencial colocar la bolsa de papel en la jarra y cerrar esta última en menos de un minuto. La reacción del ácido ascórbico con el oxígeno es exotérmica. Sin embargo, la temperatura de la bolsa de papel no excederá los 65°C. (Oxoid, 2015)

- **Incubación**

1. Introducir las placas sembradas en la jarra Gaspak.
2. Abrir el sobre de aluminio por la esquina marcada para tal fin, y extraer la bolsa de papel AnaeroGen que contiene.

3. A continuación situar la bolsa de papel AnaeroGen en la solapa del soporte de las placas que se encuentren dentro de la jarra.
4. Cerrar la tapa de la jarra inmediatamente.

Nota: el tiempo que transcurre entre que se abre el sobre de aluminio y que se cierra la jarra no debe ser mayor de 1 minuto. Una exposición más prolongada hace disminuir la reactividad y puede dar lugar a que no se consiga totalmente las condiciones anaeróbicas en la jarra.

5. Después del periodo de incubación es conveniente retirar las placas y examinarlas para determinar si existe crecimiento de anaerobios. Si las placas requieren reincubación debe utilizarse un nuevo sobre de AnaeroGen, siguiendo los procesos del 2 al 5 ya descritos.
6. Después de la incubación, la bolsa de AnaeroGen utilizada debe ser arrojada al contenedor de desperdicios de reactivos. (Oxoid, 2015)



**Figura A-5.** Incubación con bolsa de anaerobiosis

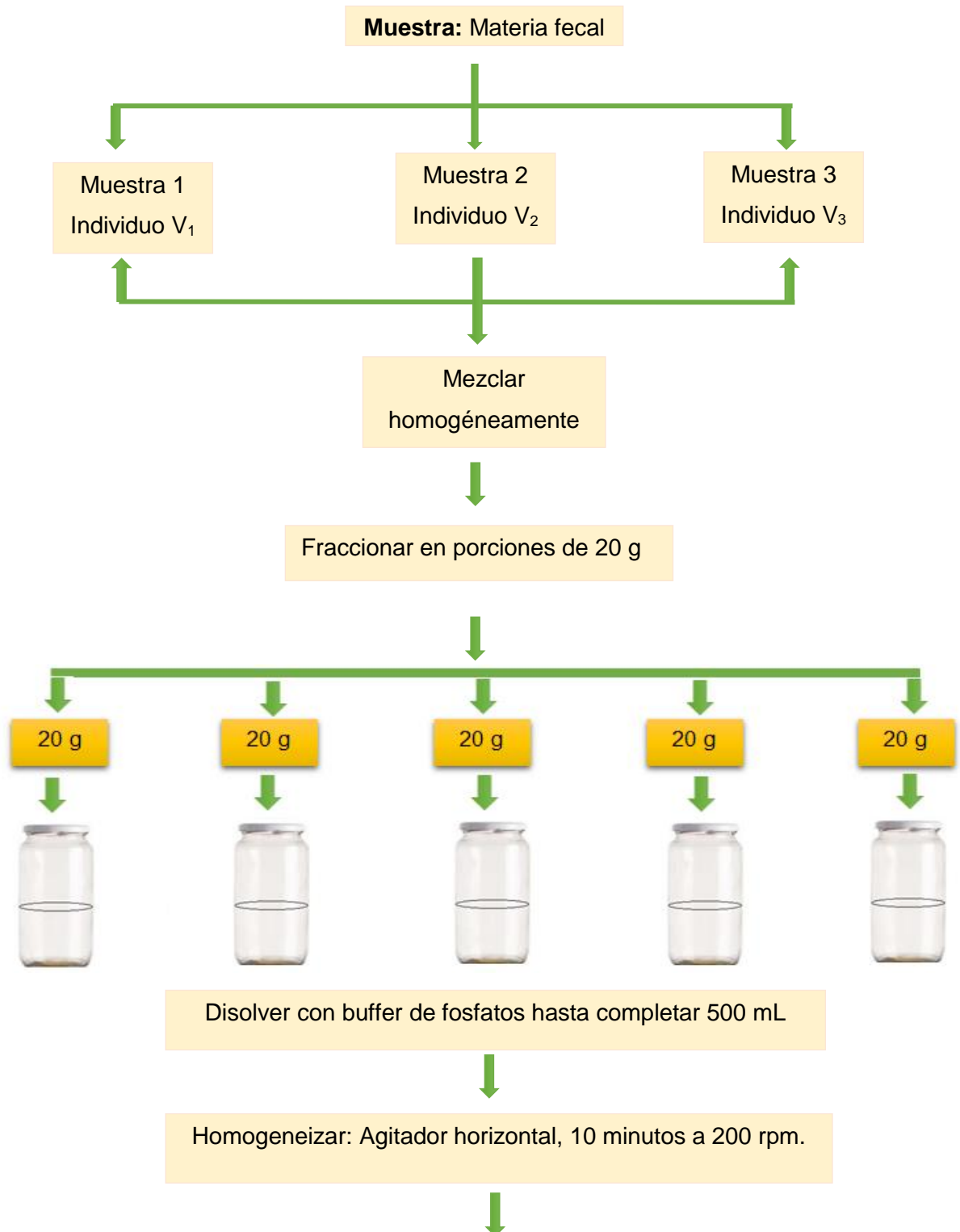
Fuente: (Registro de laboratorio)

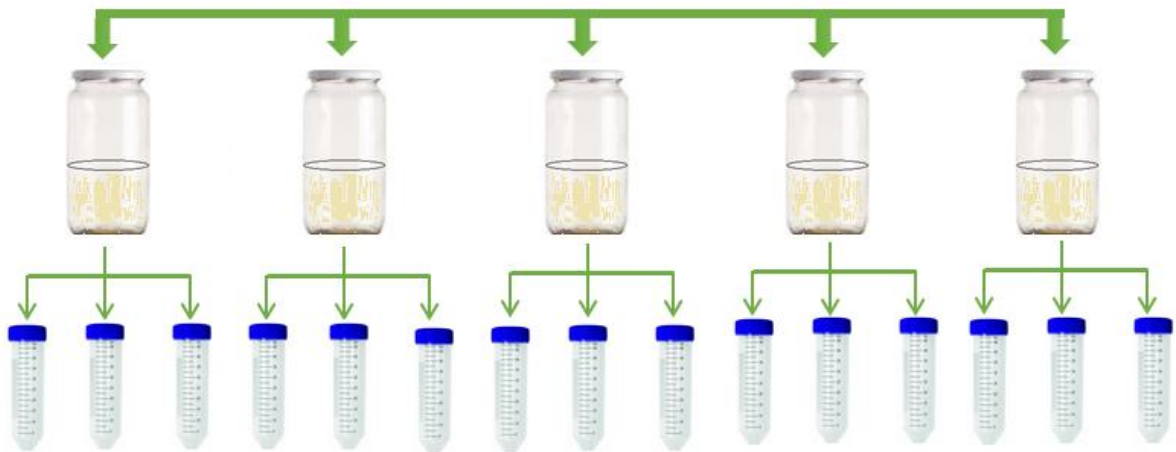
- **Almacenamiento**

A temperatura ambiente, en un lugar fresco y seco (Oxoid, 2015)



Anexo N° 6. Elaboración de la suspensión bacteriana





Dividir en tubos de 50 mL de capacidad

Centrifugar a 3000 rpm por 2 minutos a 4 °C de temperatura

Transferir el sobrenadante a nuevos frascos y descartar el sedimento.  
(200 mL en tubos falcon nuevos de 50 mL)

Adicionar a 40 mL de sobrenadante, 10 mL de glicerol y homogeneizar en vórtex.

Desplazar el O<sub>2</sub> de los frascos con nitrógeno gaseoso y sellar con capuchones metálicos de aluminio.

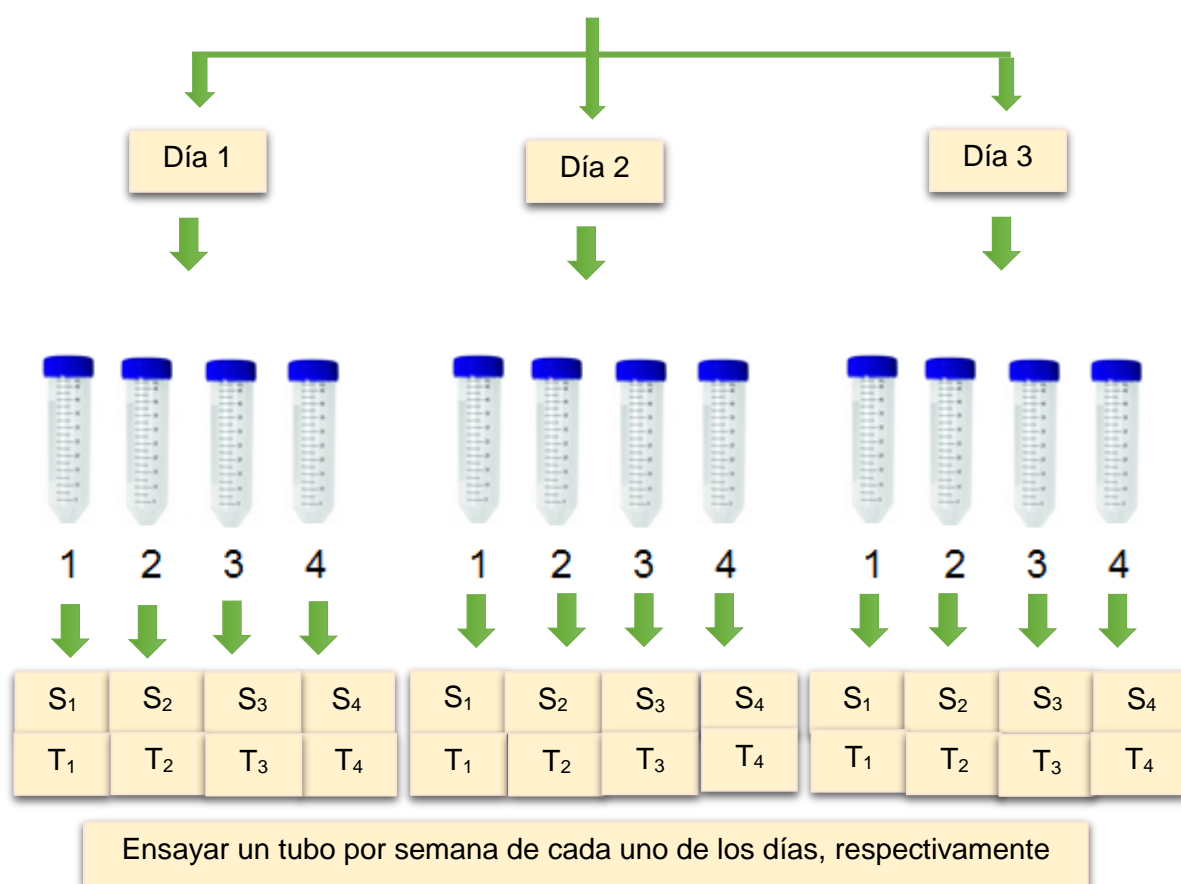
Conservar la suspensión bacteriana almacenada a -80 °C



**Anexo N° 7.** Determinación de la viabilidad bacteriana de la suspensión

**Muestra:** Suspensión bacteriana congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$

Sacar la muestra del freezer y pasarla a refrigeración por 12 horas y posteriormente a temperatura ambiente por 4 horas.

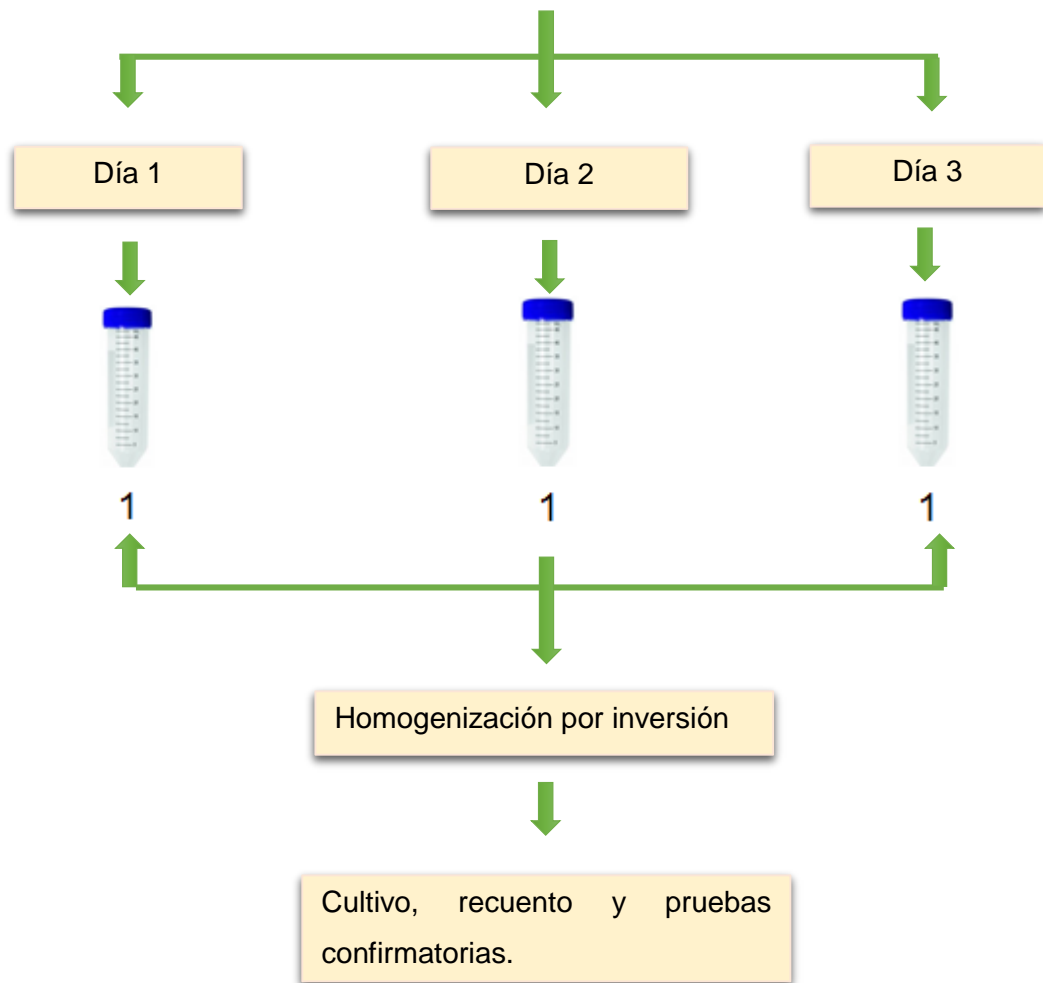


S: Semana

T: tiempo

\*: Proceder de la misma forma durante todas las semanas de análisis.

**Semana 1 = T<sub>1</sub>**





**Anexo N° 8. Tinción de Gram**

- **Técnica**

Frotis:

1. Realice un frotis fino del material de estudio y déjelo secar al aire libre.
2. Fije el material al portaobjetos pasándolo tres o cuatro veces a través de la llama de un mechero Bunsen o lámpara de alcohol, de modo que el material no se lave durante la tinción. (Koneman & Allen, 2008)

Tinción:

3. Colocar el frotis en un soporte para tinción y recubrir la superficie con solución de violeta de genciana.
4. Luego de un minuto de exposición al colorante violeta de genciana, lavar exhaustivamente con agua destilada.
5. Cubrir el frotis con solución yodada de Gram durante 1 minuto. Nuevamente lavar con agua.
6. Sujetar el frotis entre el pulgar y el dedo índice e impregnar la superficie con unas gotas de decolorante alcohol-acetona hasta que el lavado deje de tener color violeta. Esto suele tomar 10 segundos o menos.
7. Lavar con agua corriente y colocar el frotis nuevamente en el soporte para tinción. Cubrir la superficie con la tinción de safranina durante 1 minuto. Lavar con agua corriente.
8. Colocar el frotis en posición vertical en el soporte para la tinción, para permitir que el exceso de agua drene y el frotis se seque.
9. Examinar el frotis teñido bajo microscopio con el objetivo de 100x y aceite de inmersión. (Koneman & Allen, 2008)



- **Reactivos**

**Tabla A-4.** Composición de los reactivos de la tinción de Gram.

Reactivo	Componente	Concentración
<b>Violeta de genciana</b>	Violeta de genciana	2 g
	Alcohol etílico, 95%	20 mL
	Oxalato de amonio	0,8 g
	Agua destilada	100 mL
<b>Yoduro de Gram</b>	Yoduro de potasio	2 g
	Cristales de yodo	1 g
	Agua destilada	100 mL
<b>Decolorante</b>	Acetona	50 mL
	Alcohol etílico, 95%	50 mL
<b>Contracoloración</b>	Safranina O	2,5 g
	Alcohol etílico, 95%	100 mL
	Adicionar 100 mL a 100 mL de agua destilada.	

- **Interpretación**

Bacterias Gram positivas: se tiñen de color azul oscuro.

Bacterias Gram negativas: aparecen de color rosa o rojo.



**Anexo N° 9. Prueba de la catalasa**

- **Técnica**

1. Con un palillo de dientes, recoger el centro de una colonia del cultivo y colocar sobre un portaobjetos de vidrio limpio.
2. Colocar una gota de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3% sobre los microorganismos colocados en el portaobjetos con un gotero.

No invertir el orden del procedimiento ya que pueden ocurrir resultados falsos positivos.

No mezclar con el asa. No es necesario mezclar el  $H_2O_2$  y el cultivo.

3. Observar la producción inmediata de burbujeo (liberación de gas) y registrar el resultado.
4. Descartar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.

**Nota:** Puede ser difícil obtener resultados exactos si el ensayo se realiza en colonias que crecen sobre placa de agar sangre debido a la presencia de peroxidasa en los eritrocitos. Sin embargo, la reacción de peroxidasa que producen los eritrocitos es tardía y débil y puede diferenciarse con facilidad de la reacción inmediata y fuertemente activa que causan las bacterias catalasa positivas (Koneman & Allen, 2008).

- **Reactivos**

Peróxido de hidrógeno al 3%.

- **Interpretación**

Positivo (+): burbujeo inmediato, observado con facilidad; formación de  $O_2$ .

Negativa (-): ausencia de burbujas; ausencia de  $O_2$ .



**Anexo N° 10.** Prueba de producción de ácido sulfhídrico e indol y motilidad (SIM)

- **Fundamento**

Es un medio semisólido destinado a verificar la motilidad, producción de indol y de ácido sulfhídrico. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasas. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovacs, para originar un compuesto de color rojo. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de la siembra, mientras que aquellas cepas productoras de ácido sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio de mantenga a un pH mayor a 7,2. (MacFaddin, 2003)

- **Formulación g/L**

**Tabla A-5.** Composición del medio SIM.

Extracto de levadura	10 g
Peptona de caseína	10 g
Peptona de carne	6 g
Sulfato férrico de amonio	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,2 g
Agar	3,7 g
pH final: 7,3±0,2	

- **Método de preparación**

1. Suspender 30 g del polvo en 1 litro de agua destilada.
2. Llevar a ebullición, hasta disolución completa del medio.

- **Fraccionamiento**

Fraccionar alrededor de 5 mL por tubo (12 x 75 mL)

- **Método de esterilización**

Autoclave: 121 °C de calor húmedo, 15 lb de presión, 15 minutos. Dejar que el medio se enfríe en posición vertical.





## UNIVERSIDAD DE CUENCA

- **Inoculación**

Crecimiento proveniente de cultivo puro en un medio apropiado. Punzar el centro con un asa bacteriológica recta. La punción debe abarcar 2 tercios de la profundidad del medio de cultivo desde la superficie. Es importante que la siembra se realice en línea recta.

- **Incubación**

En anaerobiosis a 37 °C, 48 horas.

- **Interpretación macroscópica**

- Cepas móviles: producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra.
- Cepas inmóviles: el crecimiento se observa únicamente en la línea de siembra.
- Cepas H<sub>2</sub>S positivas: ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en el fondo del tubo.
- Cepas H<sub>2</sub>S negativas: el medio permanece sin cambio de color.

Agregar 3-5 gotas de reactivo de Kovacs:

- Cepas indol positivas: desarrollo de color rojo.
- Cepas indol negativas: sin cambio de color.

- **Características del medio**

Medio preparado: color ámbar.

- **Almacenamiento**

Medio deshidratado: 10-35 °C.

Medio preparado: 2-6 °C. (MacFaddin, 2003)



**Anexo N° 11.** Prueba de fermentación de hidratos de carbono

**CALDO CON PEPTONA Y EXTRACTO DE LEVADURA (PY) CON HIDRATOS DE CARBONO (MEDIO PARA FERMENTACIÓN CON PEPTONA Y EXTRACTO DE LEVADURA)**

- **Fundamento**

Medio alternativo para la fermentación de hidratos de carbono para microorganismos anaerobios. Contienen cisteína que reduce y mantiene el potencial de oxígeno bajo y factores de crecimiento (extracto de levadura, solución de vitamina K<sub>1</sub>-hemina) (MacFaddin, 2003).

- **Formulación g/L**

**Tabla A-6.** Composición del caldo PY

Caseína/peptona de carne	20 g
Extracto de levadura	10 g
L-cisteína	0,5 g
Solución de azul de bromotimol	5 mL
Solución tampón	40 mL
Solución de vitamina K <sub>1</sub> -hemina	10 mL
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7±0,2	

- **Método de preparación**

1. Solución tampón: conservar en refrigerador (2-6 °C)

**Tabla A-7.** Composición de la solución tampón

Cloruro de calcio, anhidro, CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,2 g
Sulfato de magnesio, anhidro, MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Fosfato dipotásico, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Fosfato monopotásico, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Cloruro de sodio, NaCl	2 g
Bicarbonato de sodio, NaHCO <sub>3</sub>	10 g
Agua destilada	1000 mL



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

2. Solución de vitamina K<sub>1</sub> y hemina: conservar en refrigerador (2-6 °C) en un recipiente cerrado protegido de la luz.

**Tabla A-8.** Composición de la solución de vitamina K<sub>1</sub> y hemina

Hemina C <sub>34</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub> FeCl *	0,5 g
Vitamina K <sub>1</sub> (fitomenadiona)	0,05 g
Hidróxido de sodio, NaOH	0,4 g
Etanol 95%	10 mL

3. Solución azul de bromotimol al 0,04%.

**Tabla A-9.** Composición de la solución de azul de bromotimol

Azul de bromotimol	10 mg
Solución hidróxido de sodio 0,01 M	16 mL
Agua destilada c.s.p.	250 mL

- Ácido: color amarillo, pH 6
- Neutro: color verde, pH 6,7
- Alcalino: color azul, pH 7,6
- Medio sin inocular: color verde, pH 7±0,2

4. Elaborar el medio completo y adicionar el hidrato de carbono.

5. Hidrato de carbono

**Tabla A-10.** Concentración de los hidratos de carbono por litro de caldo PY.

Concentración del hidrato de carbono	Hidrato de carbono
5 g/L caldo PY	Ribosa
	Trehalosa
10 g/L caldo PY	Glucosa
	Ramnosa
	Sacarosa

- **Fraccionamiento**

Tubos tapa rosca 15 x 90 mm: fraccionar alrededor de 7 mL de caldo PY por tubo.



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

- **Método de esterilización**

Autoclave: 121 °C de calor húmedo, 15 lb de presión, 15 minutos.

- **Inoculación**

Desarrollo de un cultivo puro en un medio conveniente: Medio BBE selectivo para *Bacteroides fragilis*.

Inoculación con asa bacteriológica:

- Rotar el asa sobre el desarrollo en un medio de cultivo conveniente. Utilizar un asa de inoculación para cultivo en medio líquido (asa con punta redonda).
- Introducir de manera aséptica el asa en cada tubo con hidrato de carbono.
- Agitar cada tubo con suavidad. Es necesario no humedecer con el líquido la tapa.

Cuando se inocula una batería no hay necesidad de flamear el asa entre las inoculaciones. Cuando se utiliza un asa para inocular una batería con un único inóculo, de modo que una cantidad demasiado pequeña de azúcar es transferida de un tubo a otro, ningún tubo llega a contener una mezcla de hidratos de carbono que interfiera con los resultados.

Cuando se inocula una batería, no es necesario observar realmente un inóculo apreciable en cada tubo. Un solo inóculo inicial de un cultivo contiene millones de bacterias y cada tubo recibirá una cantidad suficiente de bacterias para detectar el metabolismo (MacFaddin, 2003).

- **Incubación**

Incubar en anaerobiosis a 37 °C por 48 horas.

- **Interpretación**

Fermentación positiva (+): Caldo de color amarillo, pH 5,6 o menos.

Fermentación negativo (-): Caldo sin cambio de color (verde).

- **Características del medio**

Medio preparado: color verde

- **Almacenamiento**

En refrigeración (2-6 °C) (MacFaddin, 2003)

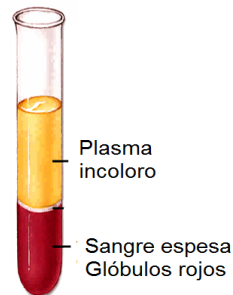
**\* ELABORACIÓN DE HEMINA**



Sangre total, EDTA. 50 mL



Centrifugar, 15 minutos, 3300 rpm: Se separa plasma de glóbulos rojos



Descartar el plasma



Lavado: 2 veces



Eritrocitos lavados (20 g)



Adicionar 30 mL agua destilada



Congelación por choque: -70 °C, 3 horas



Descongelar a temperatura ambiente

40 mL solución  
fisiológica

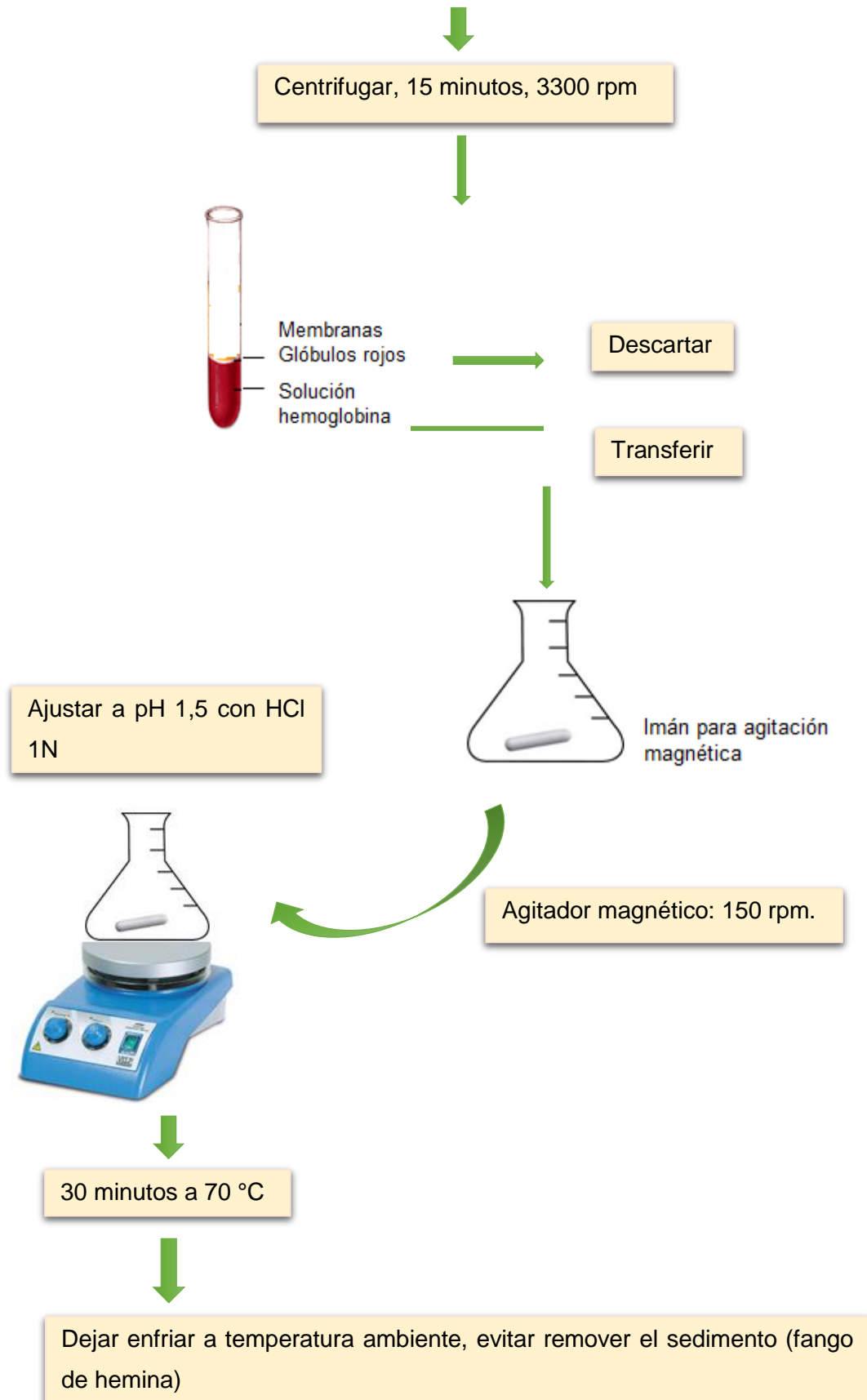


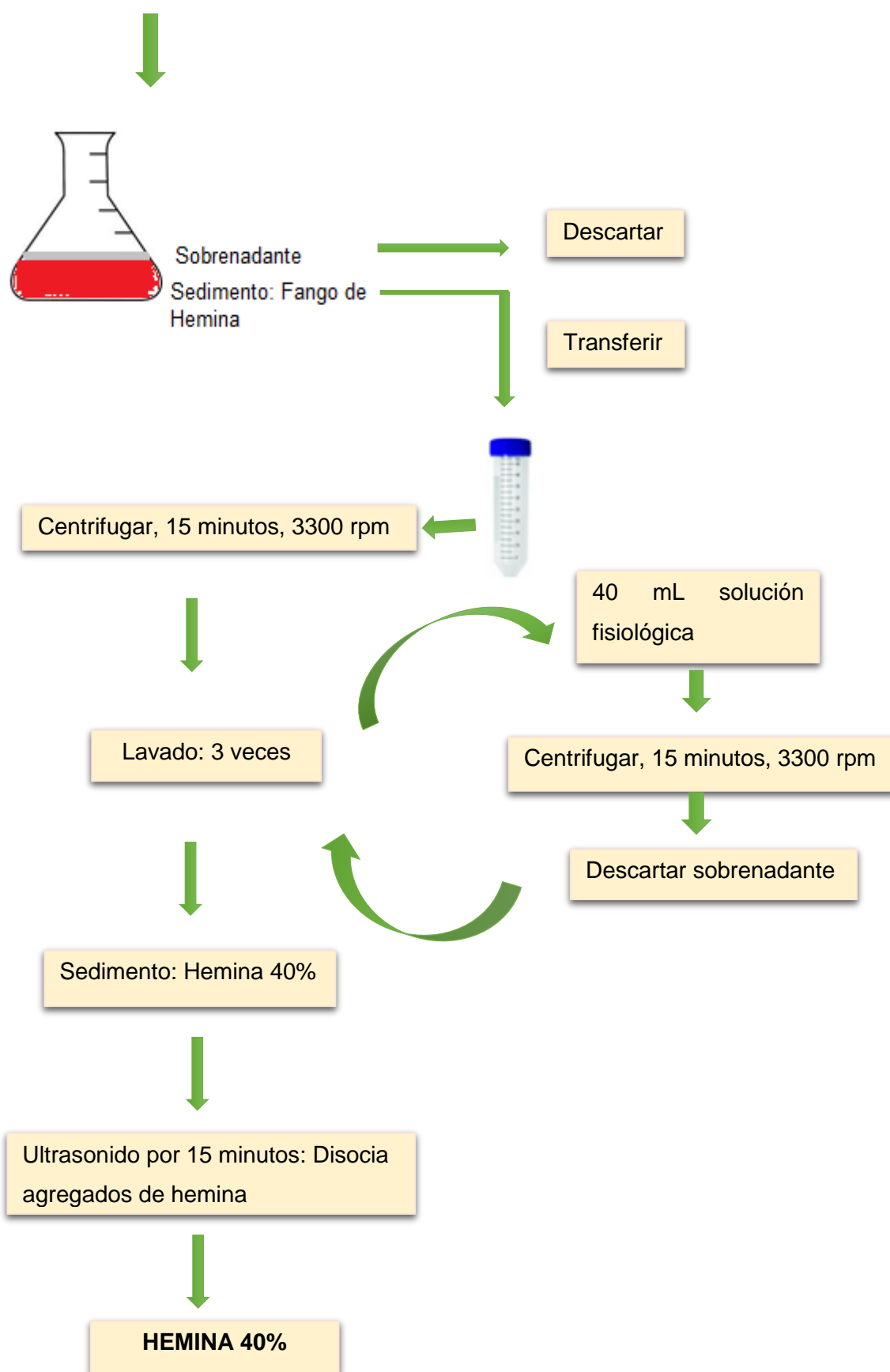
Centrifugar, 15 minutos, 3300 rpm



Descartar sobrenadante









Anexo N° 12. Prueba de lecitinasa

**AGAR LECITINA PARA ANAEROBIOS DE McCLUNG-TOABE MODIFICADO POR EL CENTRO DE CONTROL DE ENFERMEDADES (CDC)**

- **Fundamento**

Este medio permite el aislamiento y diferenciación de especies de *Clostridium* por su capacidad de producir lecitinasa que se pone de manifiesto mediante la formación de un halo de opacidad alrededor de la colonia. La formulación apoya el buen desarrollo de diversos clostridios y da halos más intensos de opacidad que los medios de cultivo con suero. (MacFaddin, 2003)

- **Formulación g/L**

**Tabla A-11.** Composición del agar lecitina para anaerobios.

Digerido pancreático de caseína	40 g
Extracto de levadura	5 g
D-Glucosa (Dextrosa)	2 g
Cloruro de sodio, NaCl	2 g
Fosfato monopotásico, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
Fosfato disódico, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5 g
Sulfato de magnesio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
Agar-agar	25 g
Agua destilada	900 mL
Emulsión de yema de huevo	100 mL
pH final 7,6±0,2	

**Nota:** el agar con tripticasa y soja, 72 g/L, puede sustituir el digerido pancreático de caseína y el extracto de levadura.

- **Método de preparación**

Emulsión de yema de huevo:

1. Limpiar y luego sumergir huevos de gallina libres de antibióticos en etanol al 95% durante 1 hora.
2. De manera aséptica aspirar o separar la yema de huevo.
3. Agregar en una probeta 50 mL de yema de huevo y aforar a 100 mL con suero fisiológico.
4. Con una pipeta estéril homogeneizar la emulsión.





Medio base:

1. Pesar los ingredientes de la formulación.
2. Suspender en 900 mL de agua destilada.
3. Llevar a ebullición hasta disolución.
4. Esterilizar
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. En condiciones asépticas, adicionar 100 mL de la emulsión de yema de huevo.
7. Con una pipeta estéril, remover para homogeneizar la suspensión. (MacFaddin, 2003)

- **Método de esterilización del medio base**

Autoclave: 121 °C de calor húmedo, 15 lb de presión, 15 minutos. Después de la esterilización, enfriar y agregar 100 mL de emulsión de yema de huevo.

- **Fraccionamiento**

En condiciones asépticas, verter de 15 a 20 mL de medio en cajas monopetri estériles procurando que la altura del agar en la caja alcance 4 mm, dejar solidificar y tapar.

- **Inoculación**

Directa: estriar en cuatro cuadrantes para el aislamiento máximo.

- **Incubación**

Incubar en anaerobiosis a 37 °C por 48 horas, placas invertidas (tapas hacia abajo).

- **Interpretación**

Positiva (+): halo opaco, opalescente (blanco lechoso) que rodea algunas colonias; el precipitado insoluble se ve mejor al trasluz.

Negativa (-): ningún halo opaco en el medio de cultivo.

- **Características del medio**

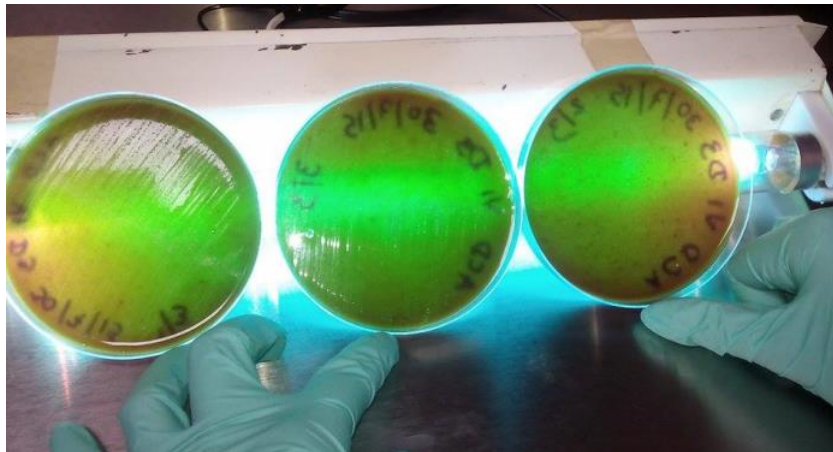
Medio en placa: color amarillento.

- **Almacenamiento**

En refrigerador (2-6 °C), con placas invertidas (tapas hacia abajo). Fecha de vencimiento aproximadamente de 2-4 semanas. (MacFaddin, 2003)

**Anexo N° 13. Fluorescencia frente a luz ultravioleta**

1. Disponer de una lámpara de luz ultravioleta de onda larga.
2. Usar lentes de protección para luz ultravioleta.
3. En una zona oscura que permita evidenciar la fluorescencia, conectar y prender la lámpara.
4. Examinar el crecimiento con luz ultravioleta para observar fluorescencia verdosa. Esto se debe realizar dentro de una hora de haber retirado la muestra de la atmósfera anaerobia. Después, de la exposición al aire, las colonias pueden volverse no viables rápidamente, lo que por lo general viene acompañado de pérdida de fluorescencia.
5. Apagar y desconectar la lámpara de luz ultravioleta.



**Figura A-6.** Fluorescencia de *Clostridium difficile* frente a luz ultravioleta.

Fuente: (Registro de laboratorio)



**Anexo N° 14.** Resultados de los recuentos (UFC/mL) en la suspensión bacteriana por individuo

Individuo	Día	N° Siembra	<i>Bacteroides fragilis</i> (UFC/mL)	<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/mL)	<i>Clostridium difficile</i> (UFC/mL)
V <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	1	8800	4800	4500
		2	8700	4500	4100
		3	8400	4300	4000
	D <sub>2</sub>	1	6400	4600	4000
		2	6500	4300	3800
		3	6300	4200	3600
	D <sub>3</sub>	1	8300	4200	3500
		2	8500	3900	3400
		3	8700	3800	3300
V <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	1	7500	5000	4900
		2	7700	4600	4600
		3	7900	4800	4400
	D <sub>2</sub>	1	7200	4800	4100
		2	7300	4500	4000
		3	7000	4200	3700
	D <sub>3</sub>	1	9100	4100	4500
		2	9000	4000	4100
		3	9300	3700	4200
V <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	1	8100	3800	3700
		2	8300	3500	3500
		3	8000	3500	3200
	D <sub>2</sub>	1	6900	3800	3500
		2	6500	3800	3700
		3	6400	3400	3500
	D <sub>3</sub>	1	6100	3600	3600
		2	6000	3400	3600
		3	6300	3300	3200



**Anexo N° 15.** Resultados de los recuentos (UFC/mL) en la suspensión bacteriana entre semanas

Semana	SB	N° Siembra	<i>Bacteroides fragilis</i> (UFC/mL)	<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/mL)	<i>Clostridium difficile</i> (UFC/mL)
T <sub>0</sub>	SB <sub>1</sub>	1	22000	9600	9400
T <sub>0</sub>	SB <sub>1</sub>	2	22200	10100	9300
T <sub>0</sub>	SB <sub>1</sub>	3	22100	9700	9400
T <sub>0</sub>	SB <sub>2</sub>	1	21000	9400	8900
T <sub>0</sub>	SB <sub>2</sub>	2	21100	9200	8500
T <sub>0</sub>	SB <sub>2</sub>	3	20900	8800	8700
T <sub>0</sub>	SB <sub>3</sub>	1	21500	8700	8000
T <sub>0</sub>	SB <sub>3</sub>	2	21700	8500	7900
T <sub>0</sub>	SB <sub>3</sub>	3	21900	8600	8100
T <sub>1</sub>	SB <sub>1</sub>	1	21100	9500	9100
T <sub>1</sub>	SB <sub>1</sub>	2	21300	9400	9100
T <sub>1</sub>	SB <sub>1</sub>	3	21000	9600	8900
T <sub>1</sub>	SB <sub>2</sub>	1	20200	8700	8400
T <sub>1</sub>	SB <sub>2</sub>	2	20300	8800	8200
T <sub>1</sub>	SB <sub>2</sub>	3	20400	9000	8500
T <sub>1</sub>	SB <sub>3</sub>	1	20700	8400	7600
T <sub>1</sub>	SB <sub>3</sub>	2	20500	8400	7700
T <sub>1</sub>	SB <sub>3</sub>	3	20600	8300	7600
T <sub>2</sub>	SB <sub>1</sub>	1	20300	8900	8800
T <sub>2</sub>	SB <sub>1</sub>	2	20000	9300	8900
T <sub>2</sub>	SB <sub>1</sub>	3	20100	9400	9000
T <sub>2</sub>	SB <sub>2</sub>	1	19500	8300	8800
T <sub>2</sub>	SB <sub>2</sub>	2	19400	8700	7900
T <sub>2</sub>	SB <sub>2</sub>	3	19300	8600	7900
T <sub>2</sub>	SB <sub>3</sub>	1	19600	8000	7500
T <sub>2</sub>	SB <sub>3</sub>	2	19800	8400	7400
T <sub>2</sub>	SB <sub>3</sub>	3	19800	7800	7300

SB: suspensión bacteriana



Semana	SB	Nº Siembra	<i>Bacteroides fragilis</i> (UFC/mL)	<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/mL)	<i>Clostridium difficile</i> (UFC/mL)
T <sub>3</sub>	SB <sub>1</sub>	1	19300	8800	8400
T <sub>3</sub>	SB <sub>1</sub>	2	19200	9300	8500
T <sub>3</sub>	SB <sub>1</sub>	3	19100	8600	8300
T <sub>3</sub>	SB <sub>2</sub>	1	18700	8400	7700
T <sub>3</sub>	SB <sub>2</sub>	2	18700	8200	7800
T <sub>3</sub>	SB <sub>2</sub>	3	18900	8100	7800
T <sub>3</sub>	SB <sub>3</sub>	1	18900	7700	7100
T <sub>3</sub>	SB <sub>3</sub>	2	18700	7900	7000
T <sub>3</sub>	SB <sub>3</sub>	3	18600	7700	7300
T <sub>4</sub>	SB <sub>1</sub>	1	17600	8400	8200
T <sub>4</sub>	SB <sub>1</sub>	2	17500	8600	7700
T <sub>4</sub>	SB <sub>1</sub>	3	17400	8800	8000
T <sub>4</sub>	SB <sub>2</sub>	1	16900	8000	7400
T <sub>4</sub>	SB <sub>2</sub>	2	16800	7900	7300
T <sub>4</sub>	SB <sub>2</sub>	3	17000	8100	7400
T <sub>4</sub>	SB <sub>3</sub>	1	17100	7500	6800
T <sub>4</sub>	SB <sub>3</sub>	2	17200	7600	6700
T <sub>4</sub>	SB <sub>3</sub>	3	17200	7700	6800

SB: suspensión bacteriana